
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Klára Steklíková

Testování embryotoxicity léků na zárodku kuřete

Testing of drugs embryotoxicity on chicken embryo

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. MUDr. Miroslav Peterka, DSc.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Miroslavu Peterkovi, DSc., za čas který mi věnoval a za jeho cenné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala kolektivu z Oddělení teratologie ÚEM AV ČR, zejména Mgr. Petře Herlové, Mgr. Kateřině Ločovské, MUDr. Renatě Peterkové, CSc., Mgr. Oldřichu Zahradníčkovi, PhD. a Mgr. Zuzaně Pavlíkové, za pomoc a spolupráci při získávání dat potřebných k sepsání práce. Ráda bych také poděkovala Mgr. Ivě Němečkové za pomoc při statistickém zpracování dat a v neposlední řadě svým rodičům, partnerovi a přátelům za jejich pochopení a vytrvalou podporu při studiu a sepsování této práce.

Abstrakt

Vývoj plodu může být negativně narušen vnějšími faktory, které mohou zapříčinit vznik vývojových vad. Takové faktory jsou nazývány teratogeny a spadají mezi ně mimo, fyzikálních a biologických také chemické látky včetně některých běžně užívaných léčiv, kterým je doporučováno se v těhotenství vyhýbat. V případě žen s chronickým onemocněním, jakým je například diabetes mellitus, je ale nutná trvalá medikace i během těhotenství. Je proto třeba zajistit léčivo a dávku, které jsou pro užívání je v těhotenství bezpečné.

Při zjišťování embryotoxicity léků se uplatňují prospektivní a retrospektivní epidemiologické studie, které jsou doplňovány výsledky získanými v experimentálních studiích. Dle doporučení OECD (organization for economic co-operation and development) je klasické testování prováděno na dvou odlišných savčích druzích. Tyto výzkumy jsou ovšem limitovány rozdílnou farmakokinetikou a biotransformací, kterým látka v mateřském organismu podléhá. Proto se při alternativním testování využívají takové metody, které vliv mateřského organismu vyloučí. Jedním z modelových organismů toto umožňující je zárodek kuřete. Ten mimo jiné může na rozdíl od testování na buněčných či tkáňových kulturách poskytnout i komplexní informace o působení testovaného faktoru na organismus jako celek. Za tímto účelem byla vyvinuta v naší laboratoři nová *in vitro* metoda SANDWICH, která navíc umožňuje chronickou expozici zárodku testované látky, čímž zvyšuje senzitivitu testování.

Potomci matek s diabetem mají zvýšené riziko vzniku vývojových vad, zejména kardiovaskulární a nervové soustavy. Ty se u nich objevují až 4,5, respektive třikrát častěji. Jednou z nejrizikovějších vad je však syndrom kaudální regrese, který je ve srovnání s fyziologickými těhotenstvími u dětí matek s diabetem až 26krát častější.

Cílem této práce bylo za pomoci *in vitro* metody SANDWICH otestovat vliv humánního inzulínu na modelu vyvíjejícího se zárodku kuřete a potvrdit, či vyvrátit možnost vyvolání pozorovaných vývojových vad.

Získané výsledky odhalily embryotoxický efekt inzulínu podaného kuřecím zárodkům v koncentracích 10^{-6} až 10^{-4} mg/ml, kdy se projevoval letalitou, růstovou retardací a malformacemi zárodků. Pozorované vývojové vady byly defekty v tvorbě vitelinních cév a napojení zárodku na *area vasculosa*, tvorba krevních sraženin v dolních končetinových pupenech, defekty tvorby neurální trubice v kaudální části a defekty v růstu kaudální části,

kdy zárodky exponované inzulinem vykazovaly její zkrácení. Dále jsme pozorovali u zárodků vystavených vlivu inzulinu apoptotické elementy v neurální trubici a končetinových pupenech, které u kontrolních zárodků nebyly patrné.

Tyto výsledky naznačují, že jedním z faktorů vyvolávající defekty kardiovaskulární a neurální soustavy by mohla být právě aplikace terapeutického humánního inzulinu, stejně jako v případě tvorby syndromu kaudální regrese. Je proto nezbytné při výběru medikace těhotných diabetiček vyhodnotit všechna rizika a benefity a naplánovat léčbu tak, aby, v případě nutnosti aplikace terapeutického inzulinu, lékaři pečlivě uvážili používání humánního inzulinu a optimalizovali jeho dávku.

Klíčová slova: Diabetes, vrozené vady, těhotenství, inzulín

Abstract

The embryonal development could be negatively disrupted by exogenous factors, which could cause developmental defect. These factors are called teratogens and amongst them there are not only physical and biological but also chemical substances including some of commonly used drugs. Those substances are recommended not to be use in pregnancy. In case of women with chronical disease, for example diabetes mellitus, permanent medication is necessary also during pregnancy. Therefore it is important to ensure medicament and dose, which are safe for use during pregnancy.

For finding out the embryotoxicity of drugs the prospective and retrospective epidemiological studies are used, which are supplemented by results from experimental studies. According to OECD (organization for economic co-operation and development) recommendations the classical testing is performed on two different mammalian species. Those experiments are limited by different pharmacokinetics and biotransformation, which affects substances in maternal organism. Therefore for alternative embryotoxicity testing are used such methods, that exclude this impact. One of these model organisms that enable this is chicken embryo. Chicken embryo, unlike cellular and tissue cultures, can provide complex information about effect of tested substance on the whole organism. For this purpose new *in vitro* SANDWICH method was developed in our laboratory, which also allows chronical exposition of tested substance, which increases testing sensitivity.

Offsprings of mothers with diabetes have higher risk of developmental defects, especially of cardiovascular and neural structures. These defects appear by these offsprings 4,5 respectively three times more often. One of the defects with highest risk is syndrome of caudal regression, which is in comparison to physiological pregnancies in diabetic up to 26 times more frequent.

Aim of this work was to evaluate the effect of humane insulin on developing chicken embryo by using the *in vitro* method SANDWICH and to confirm or disprove the possibility of causing the observed developmental defects.

Our results uncovered embryotoxic effect of insulin on exposed chick embryo in concentrations from 10^{-6} to 10^{-4} mg/ml which exhibited letality, growth retardation and malformations. Observed developmental defects were in creation of vitelline vessels and connections on *area vasculosa*, creation of blood clots in neural tube and lower limb buds,

neural tube defects of caudal part of embryo and defects of growth of caudal part of embryo. Insulin exposed individuals showed a shortening of it. We also observed apoptotic elements in lower limb buds that were not present by the control embryos.

These results suggest that one of the factors causing developmental defects of cardiovascular and neural systems could be application of therapeutical human insulin as well as in the case of development of syndrome of caudal regression. For this reason it is necessary to evaluate every risks and benefits of medication and physicians should carefully consider using of human insulin and optimize its dose in case of application of therapeutical insulin.

Keywords: Diabetes, birth defects, pregnancy, insulin

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt | 4 |
| Abstract | 6 |
| Obsah..... | 8 |
| Seznam zkratek | 11 |
| 1 Úvod..... | 13 |
| 1.1 Teratologie..... | 13 |
| 1.1.1 Příčiny vzniku vývojových vad | 14 |
| 1.1.2 Základní principy vzniku vývojových vad | 14 |
| 1.1.3 Experimentální přístupy v teratologii | 16 |
| 1.1.4 Kuřecí zárodek jako modelový organismus v teratologii | 18 |
| 1.2 Diabetes Mellitus..... | 19 |
| 1.2.1 Prediabetes | 19 |
| 1.2.2 Diabetes mellitus I. typu | 19 |
| 1.2.3 Diabetes mellitus II. typu | 20 |
| 1.2.4 Gestační diabetes mellitus..... | 21 |
| 1.2.5 Specifické typy diabetu | 21 |
| 1.2.6 Léčba..... | 21 |
| 1.3 Diabetes mellitus v těhotenství..... | 22 |
| 1.3.1 Těhotenské a poporodní komplikace způsobené diabetem..... | 23 |
| Makrosomie a riziko porodu císařským řezem | 23 |
| Růstové zpoždění | 23 |
| Fetální a neonatální úmrtí | 24 |
| Syndrom respirační tísně..... | 24 |
| Pre-eklampsie..... | 24 |
| 1.3.2 Vývojové vady spojené s diabetem v těhotenství | 24 |
| Defekty centrální nervové soustavy | 25 |
| Defekty kardiovaskulární soustavy..... | 26 |
| Defekty vylučovací soustavy | 27 |

| | |
|--|----|
| Defekty gastrointestinálního traktu | 27 |
| Defekty kosterní soustavy | 28 |
| Další defekty spojované s diabetem | 29 |
| 1.3.3 Možné mechanismy vzniku vývojových vad | 30 |
| Hyperglykémie | 30 |
| Zvýšená míra oxidativního stresu | 31 |
| Aplikace terapeutického inzulínu | 31 |
| Genetické faktory | 32 |
| 1.4 Inzulín | 32 |
| 1.4.1 Terapeutický inzulín | 33 |
| 1.4.2 Kuřecí inzulín | 33 |
| 2 Cíle práce | 35 |
| Materiál | 36 |
| 2.1 Modelový organismus | 36 |
| 2.2 Inzulín | 36 |
| 3 Metody | 37 |
| 3.1 SANDWICH | 37 |
| 3.1.1 Kultivace embryí před pokusem | 37 |
| 3.1.2 Příprava živného média | 37 |
| 3.1.3 Příprava pracovní plochy | 38 |
| 3.1.4 Přenesení zárodků do <i>in vitro</i> systému | 38 |
| 3.1.5 Sledování a vyhodnocení pokusu | 39 |
| 3.2 Statistické zpracování dat | 40 |
| 3.3 Detekce apoptózy | 40 |
| 3.3.1 Histologické zpracování tkáně | 40 |
| Fixace | 40 |
| Zalítí do parafínu | 41 |
| Krájení a lepení na sklíčka | 41 |
| 3.3.2 Imunohistochemie | 41 |
| TUNEL | 41 |

| | |
|---|----|
| Barvení a montování tkáně | 42 |
| 3.4 Detekce krevních sraženin v končetinových pupenech..... | 42 |
| 3.4.1 Histologické zpracování tkáně | 43 |
| Fixace | 43 |
| Zalítí do parafinu..... | 43 |
| Krájení a lepení na sklíčka | 43 |
| 3.4.2 Barvení vzorků..... | 44 |
| 4 Výsledky | 45 |
| 4.1 Inzulín dose response | 45 |
| 4.2 Kontrolní skupina | 46 |
| 4.3 Efekt jednotlivých koncentrací inzulínu..... | 46 |
| 4.3.1 Inzulín v koncentraci 10^{-4} mg/ml..... | 46 |
| 4.3.2 Inzulín v koncentraci 10^{-5} mg/ml..... | 47 |
| 4.3.3 Inzulín v koncentraci 10^{-6} mg/ml..... | 48 |
| 4.3.4 Inzulín v koncentraci 10^{-7} mg/ml..... | 49 |
| 4.4 Embryotoxický efekt inzulínu | 50 |
| 4.4.1 Vliv na vývoj kaudální části | 50 |
| 4.4.2 Vliv na napojení vitelinních cév | 55 |
| 5 Diskuze..... | 57 |
| 5.1 Kaudální část zárodku | 59 |
| 5.2 Metoda SANDWICH | 59 |
| 6 Závěry | 63 |
| 7 Použitá literatura | 64 |
| 7.1 Internetové zdroje..... | 70 |
| 8 Přílohy..... | 71 |
| 8.1 Přenesení zárodku do <i>in vitro</i> systému..... | 71 |
| 8.2 Video porovnávající vitalitu zárodku exponovaného inzulínem a kontrolního | 73 |

Seznam zkratk

| Zkratka | Význam |
|---------------|---|
| AE | Apoptotické elementy |
| AER | z anglického apical ectodermal ridge |
| BMP/4 | z anglického bone morphogenetic protein/4 |
| Cd | z anglického crooked |
| CHEST | z anglického Chick embryotoxicity screening test |
| CNS | Centrální nervová soustava |
| D | Mrtvé zárodky (z anglického death) |
| DM | Diabetes mellitus |
| DM1 | Diabetes mellitus typu 1 |
| DM2 | Diabetes mellitus typu 2 |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| EC | z anglického early chick |
| ED | Embryonální den |
| ER | Erytrocyty |
| GDM | Gestační diabetes mellitus |
| GIT | Gastrointestinální trakt |
| HH | Vývojové stadium zárodku kuřete podle Hamburgera a Hamiltona |
| HNF/1β | z anglického hepatocyte nuclear factor/1β |
| CH | Chorda |
| KP | Končetinové pupeny |

| | |
|----------------|--|
| KS | Kosterní soustava |
| KVS | Kardiovaskulární soustava |
| M | Malformované zárodky |
| Mez | Mezenchym |
| MODY | z anglického Maturity-onset diabetes of the young |
| Msx - 2 | z anglického homeobox gene 2 |
| N | Zárodky vykazující normální fenotyp |
| NS | Nervová soustava |
| NT | Neurální trubice |
| OECD | z anglického Organization for economic co-operation and development |
| Pax - 3 | z anglického paired box 3 |
| PGM | Porucha glukózového metabolismu |
| PGT | Porucha glukózové tolerance |
| Rf | z anglického rib fusion |
| RSD | z anglického respiratory distress syndrome |
| Shh | z anglického sonic hedgehog |
| VS | Vylučovací soustava |
| VV | Vývojové vady |
| WHO | z anglického World Health Organization |

1 Úvod

1.1 Teratologie

Teratologie je obor zkoumající příčiny a mechanismy abnormálního vývoje plodu. Výsledkem jsou defekty, které nazýváme vývojovými vadami (VV). Tento pojem je podle Kučery (1989) definován jako projev abnormálních vývojových pochodů vyvolaných genetickými a/nebo negenetickými faktory, které zasahují primárně buňky a následně vedou k alternativnímu vývoji tkáně, orgánu, nebo celého orgánového systému. Výsledkem jsou nepravidelnosti, redukce anebo nadbytek struktur měnící jejich funkčnost zejména ve smyslu snížení až vymizení.

První zmínky o pozorování nestandardního vývoje jedince pocházejí už z doby kamenné a jsou zaznamenávány v celém průběhu lidských dějin. Například na tabulkách pocházejících z dob Babylonské říše jsou zachovány detailní popisy pozorovaných defektů. Narození jedince s VV bylo v těchto dobách využíváno k proroctví a věštění osudu panovníků a říše, často bylo spojováno s různými pověrami anebo aktivitou bohů. Ale již v roce 1651 vyslovil William Harvey teorii, že vrozená vada představuje abnormální pokračování embryogeneze (Peterka a Novotná, 2010).

I přes to se ale do 40. let 20. století věřilo, že lidské zárodky jsou před nepříznivými faktory zevního prostředí chráněny plodovými obaly. První dostatečně podložený důkaz přinesl až v roce 1941 Gregg, který spojil působení viru zarděnek s defekty očí, uší a srdce. Dalším významným milníkem v historii teratologie pak bylo popsání těžkých končetinových anomálií a dalších VV v důsledku užívání léčiva Thalidomidu v časných stádiích těhotenství (Moore a Persaud, 2002).

Progrese tohoto vědního oboru vedla k jeho rozdělení do tří kategorií: (1) experimentální, pozorující efekty exogenních faktorů na zvířeti (2) klinická, hledající příčinu vzniku VV manifestovanou u lidského zárodku/dítěte a (3) epidemiologická, která hodnotí a porovnává soubory abnormálních fenotypů v rámci určitého časového úseku (Kučera, 1989).

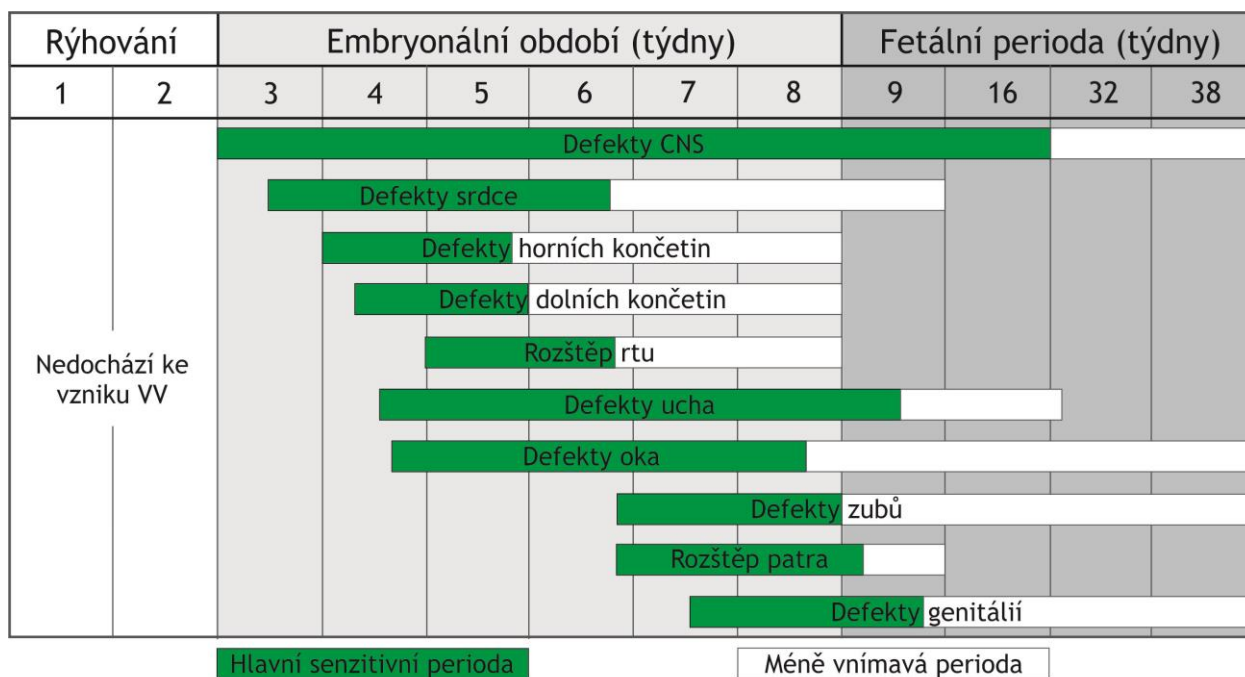
1.1.1 Příčiny vzniku vývojových vad

Příčiny VV jsou děleny na faktory genetické a environmentální. Mnoho z nich však vzniká jejich společným působením, tedy na podkladu multifaktoriální dědičnosti. U 50-60% VV nejsme schopni určit příčinu vzniku. U těch, u kterých je příčina známa, je až polovina vyvolána multifaktoriálně, 14-20% je způsobeno faktory prostředí a 26-30% zapříčiňují genetické faktory (Moore a Persaud, 2002).

Zevní faktory schopné svým působením vyvolat VV nazýváme teratogeny. V dnešní době je známo poměrně mnoho teratogenů, které jsou rozděleny do několika skupin. První skupinou jsou fyzikální faktory, mezi které řadíme radiaci a hypertermii. Další skupinou jsou biologické faktory, kam náleží onemocnění způsobené virovými, bakteriálními a parazitárními infekcemi, jako například první objevený teratogen - virus zarděnek. Velkou skupinu teratogenů tvoří chemické faktory. Sem jsou řazeny léky (např. Thalidomid, Tetracyklin, antiepileptika, aj.) a další chemikálie, vyskytující se v okolním prostředí. V neposlední řadě má na vývoj dítěte vliv samotný mateřský organismus a jeho onemocnění jako je např. Diabetes mellitus (DM), astma, či epilepsie (Ujházy *et al.*, 2014).

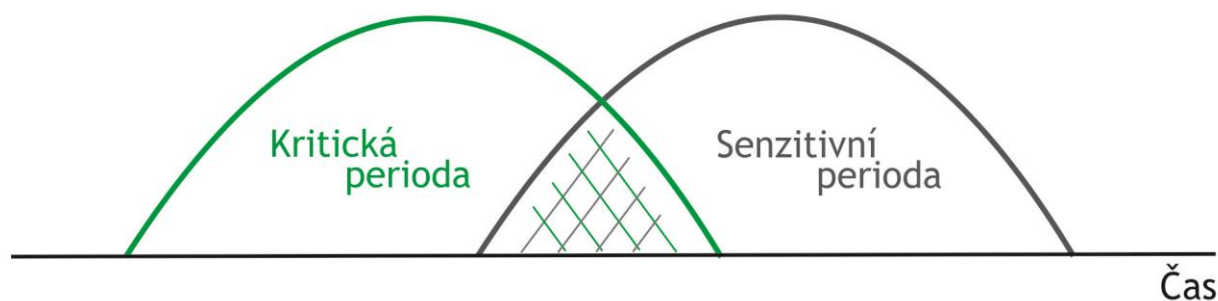
1.1.2 Základní principy vzniku vývojových vad

Orgány a orgánové soustavy zárodku jsou nejcitlivější k působení teratogenu v období své intenzivní diferenciaci. Takovéto období nazýváme kritickou periodou, tedy období, kdy lze narušit vývoj daného orgánu působením zevních faktorů. Pro každý orgánový systém je tato perioda přítomna v jiném časovém úseku (Obr. 1). Například pro poškození mozku je nejkritičtější období mezi 3. a 16. týdnem, ale malé defekty v jeho vývoji mohou být vyvolány i později, protože jeho růst a diferenciaci pokračují až do porodu a dále se vyvíjí až do dvou let dítěte (Moore a Persaud, 2002).



Obrázek 1. Kritické periody orgánových soustav. První dva týdny prenatalního vývoje zárodek reaguje na teratogeny odpovědí „vše nebo nic“, ty buď poškodí celé embryo a to zaniká, nebo je jejich efekt vykompenzován a zárodek se dál vyvíjí normálně. Tzn., v tomto období nevznikají žádné VV. Zeleně jsou vyznačeny periody, které jsou vysoce kritické pro působení teratogenu. Vystavení embrya teratogenním vlivům v tuto dobu může mít za následek vznik těžké strukturální VV. Bíle jsou znázorněna méně citlivá období, během kterých může docházet ke vzniku funkčních defektů a drobných anomálií (upraveno podle Moore a Persaud, 2002).

Nezávisle na kritických periodách existují periody senzitivní. Během nich se diferencující buňky stávají citlivými k teratogenu. Látky obecně cytotoxické jsou například nejúčinnějšími teratogeny v období velmi časných vývojových stadií a s věkem plodu jejich účinnost klesá. Naopak teratogenní potenciál látek se specifickým účinkem pozorujeme až v pozdějších stadiích, kdy už jsou v tkáni exprimované specifické receptory. Pouze pokud se tyto dvě periody během vývoje zárodku vyskytnou současně, může dojít ke vzniku VV. (Obr. 2) (Peterka a Novotná, 2010).



Obrázek 2 Zobrazení kritické a senzitivní periody. Pouze pokud se během vývoje zárodku vyskytnou současně (šrafovaná část) může působením teratogenu dojít ke vzniku VV (upraveno podle Peterka a Novotná, 2010).

Citlivost k teratogenu je také závislá na genotypu zárodku. Specifické geny mohou ovlivnit, zda se teratogenní efekt projeví a v jaké míře se projeví. Konečný výsledek působení negativního faktoru ovlivňuje i mateřský organismus a jím zprostředkovaná biotransformace a farmakokinetika příslušné látky (Ujházy *et al.*, 2014).

1.1.3 Experimentální přístupy v teratologii

Z etických a legislativních důvodů není možné testovat teratogeny a následně sledovat mechanismy vzniku VV přímo na člověku. Proto je nutné informace o možnosti vyvolání VV konkrétním vnějším faktorem získat jinými způsoby. V prospektivních studiích jsou přinášeny důkazy, že po vystavení těhotných žen dané látce dochází ke zvýšení výskytu anomálií nad přirozenou frekvenci. Dalším způsobem získání důležitých podkladů jsou retrospektivní studie. Při nich je dohledáváno, zda se u malformovaných v porovnání se zdravými dětmi nevyskytuje expozice danému faktoru častěji. Taková data je ovšem těžké získat, protože si při zpětném zjišťování potřebných informací nemůžeme být jisti, zda máme 100% informací o daném případě nebo zda vývoj nebyl ovlivněn dalšími faktory. Proto jsou tyto studie doplňovány experimentálně získanými daty (Moore a Persaud, 2002).

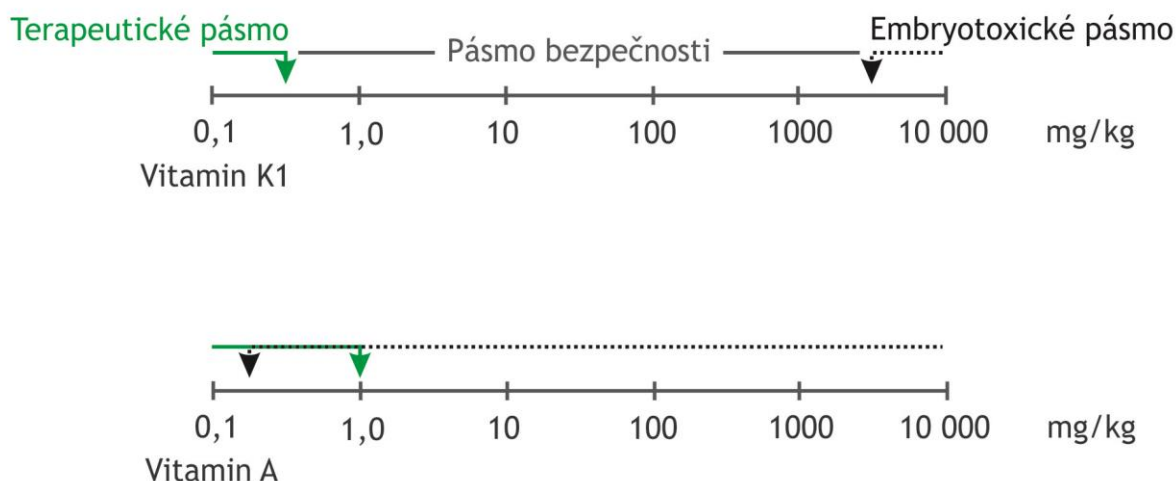
Zejména pokud jde o léky, je důležité, abychom věděli, zda je těhotné ženy mohou užívat, či nikoli. Jedno z prvních celosvětových doporučení k testování embryotoxicity léků vydala WHO („World Health Organization“) v roce 1967. Doporučují testování na savcích (např. myši, králíci, prasata, aj.), nedoporučují však testování na ptačím modelu a to z důvodů velké anatomické a fyziologické odlišnosti. Aplikace testované látky by měla probíhat stejnou cestou, jakou je plánováno užívání léku a ve stejných dávkách odpovídajícím plánované výši terapeutických dávek. Výsledný vliv testované látky na zvířecí model by měl být porovnán s daty epidemiologických studií. V dnešní době je doporučováno testovat efekt potenciálního teratogenu na jednom hlodavci a jednom nehlodavci. Testovaná látka by měla být podávána ve třech dávkách, přičemž nejvyšší dávka by měla mít toxický efekt, ale neměla by způsobit smrt a nejnižší by toxicky působit neměla. Výška dávky by měla být přizpůsobena tělesné hmotnosti modelového organismu (OECD, 2001).

Testování na laboratorních savcích má ale svoje limity. Jedním z nich je, že nepočítají s prahovým jevem, čím popírají existenci neúčinného dávkového pásma. Pro každou látku je třeba určit začátek pásma embryotoxicity, tedy nejmenší dávku, která již významně zvýší projev embryotoxicity ve srovnání s kontrolou. Pokud toto není zohledněno, prakticky to znamená, že za teratogen může být označena látka, přesto, že účinné dávky vysoce přesáhly maximální

možnou expozici u člověka (maximální terapeutickou dávkou pro lék). Další nevýhodou je mezidruhová odlišnost v reakci na zkoušenou látku. Mateřský organismus odlišných druhů má i odlišnou farmakokinetiku, která může ovlivnit reakci plodu. Také je třeba brát v potaz, že léky jsou testovány na zdravých zvířatech, ale člověku jsou podávány při onemocnění, to je další možnost zkreslení výsledku (Peterka a Novotná, 2010).

Proto byly vyvinuty alternativní přístupy, které umožňují mateřský organismus jako zdroj mezidruhové variability vyřadit. Tyto přístupy zahrnují testování na buněčných liniích a kmenových buňkách, testování na mikromasách buněčných populací jako jsou končetinové pupeny, nebo neurální buňky, testování na nižších obratlovcích (*Xenopus laevis*, *Danio rerio*) a bezobratlých (*Drosophila*), testování na kulturách celých savčích embryí a testování na kuřecím zárodku (Brown *et al.*, 1995).

Výsledkem je určení začátku pásma embryotoxicity a jeho porovnáním s terapeutickou dávkou, nebo dávkou maximální možné expozice, určit pásmo bezpečnosti (Obr. 3). Čím větší tento rozdíl je, tím méně pravděpodobná je možnost ovlivnění zárodku expozicí této látky (Peterka a Novotná, 2010). Méně pravděpodobná proto, že z výsledků testování na zvířatech, či alternativních testů nelze se stoprocentní jistotou vyvodit, jak bude daná látka působit na člověka. Správně provedené pokusy dokáží naznačit potenciální riziko, negativní výsledek však nemůže být považován za záruku bezpečnosti i pro člověka.



Obrázek 3 Pásmo bezpečnosti. Zelená šipka představuje terapeutické pásmo, přerušovaná čára s černou šipkou embryotoxické pásmo. Pokud se tato pásma nepřekrývají, nazýváme rozdíl mezi nimi pásmo bezpečnosti (šedá čára – horní diagram). Pokud se překrývají (dolní diagram), není bezpečné látku v těhotenství užívat (upraveno podle Peterka a Fára, 1990).

1.1.4 Kuřecí zárodek jako modelový organismus v teratologii

Využití kuřecího zárodku k testování embryotoxicity nejrozličnějších faktorů přináší řadu výhod. Za největší z nich můžeme považovat eliminaci vlivu mateřského organismu. Rozdílná farmakokinetika odlišných živočišných druhů je velkým zdrojem mezidruhové variability a významně ovlivňuje výsledky testování (viz kapitola 1.3.1 Experimentální přístupy v teratologii). Další nespornou výhodou je možnost vyloučení spontánně malformovaných jedinců a jedinců, u kterých došlo k poškození kvůli nesprávné manipulaci během pokusu (Peterka a Novotná, 2010).

Jednou z nejběžněji používaných alternativních metod v teratologii, při kterých je modelovým organismem zárodek kuřete je metoda CHEST (Chick embryotoxicity screening test). Tato metoda byla vyvinuta a patentována českými vědci Jelínkem, Rychterem a Perkou v roce 1979 (Jelínek *et al.*, 1979), kteří s její pomocí otestovali embryotoxicitu značného množství faktorů (např. Jelínek *et al.*, 1985, Peterka a Fára, 1990, Peterka *et al.*, 1992, Peterka *et al.*, 1994a, Peterka *et al.*, 1994b, Peterka *et al.*, 1996, Krausová a Peterka, 2007). Testovaná látka je zárodku aplikována subgerminálně nebo intraamniálně do vajíčka okénkem ve skořápce, které je pak uzavřeno parafínovým rámečkem a sterilním sklem. K aplikaci dochází 2 - 5ED, aby byly pokryty kritické periody vývoje základů všech orgánových soustav, zárodky, jsou průběžně kontrolovány, aby byla zaznamenána případná smrt a v 8 nebo 9ED pak dochází k odběru zárodků a diagnostice VV.

V naší laboratoři byla za účelem testování teratogenního efektu různých látek na časná embryonální stadia (ED2) vyvinuta nová metoda nazvaná SANDWICH. Tato metoda vychází z kultivační techniky vyvinuté podle New (1955), při které byl zárodek přenesen z přirozeného prostředí na hodinové sklíčko s bílkem, přichycen skleněným kroužkem a následně inkubován. Při SANDWICH metodě dochází také k vyjmutí zárodku z přirozeného prostředí, ten je umístěn mezi dva kroužky z filtračního papíru a přenesen na Petriho misku s živným médiem, které může obsahovat testovanou látku (více viz kapitola 3.3 SANDWICH). Díky chronické expozici zárodku testované látce předpokládáme u této metody větší senzitivitu v odhalování potenciálních teratogenů a díky tomu vylepšení testování teratogenicity faktorů za pomoci alternativních testů.

1.2 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) je komplexní chronické onemocnění vyznačující se abnormalitami v metabolismu sacharidů, tuků a bílkovin, které jsou zapříčiněny nedostatečným působením insulinu v cílových tkáních. Defekty v jeho působení jsou vyvolány nedostatečnou sekrecí a/nebo utlumením tkáňové odpovědi (American Diabetes, 2014). Podle mechanismu vzniku je toto onemocnění děleno do několika základních skupin (viz. dále).

S růstem urbanizace, světové populace, incidence obezity a poklesem fyzické aktivity úměrně vzrůstá i počet jedinců, kterým je DM diagnostikován. Odhaduje se, že během let 2000 až 2030, respektive 2050 dojde ve světové populaci k více než zdvojnásobení jedinců postižených touto nemocí (Boyle *et al.*, 2001, Wild *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2010). Největší nárůst je očekáván zejména v rozvojových zemích (Shaw *et al.*, 2010). Tyto výsledky naznačují, že se DM stává stále se zvětšujícím celosvětovým problémem, který bude nutné řešit. Vzhledem k výskytu tohoto onemocnění i u žen v reprodukčním věku, je nutné brát v potaz možné ovlivnění vývoje plodu jak nemocí samotnou, tak léčbou, kterou pacientky vyžadují i během těhotenství.

1.2.1 Prediabetes

Prediabetes ještě není onemocnění jako takové. Vyznačuje se poruchami v glukózové toleranci (PGT), či glukózovém metabolismu (PGM), kdy pacienti ještě nedosahují hodnot, pro diagnostikování DM, ale již se jim dlouhodobě výrazně přibližují. Pokud není přistoupeno k preventivním opatřením, jako je např. změna jídelníčku, zvýšení fyzické zátěže a redukce tělesné hmoty o 5-10%, může velmi rychle dojít k plnému rozvoji onemocnění. I přes všechna tato preventivní opatření jsou pacienti s prediabetem vysoce rizikovou skupinou pro manifestaci DM (American Diabetes, 2012).

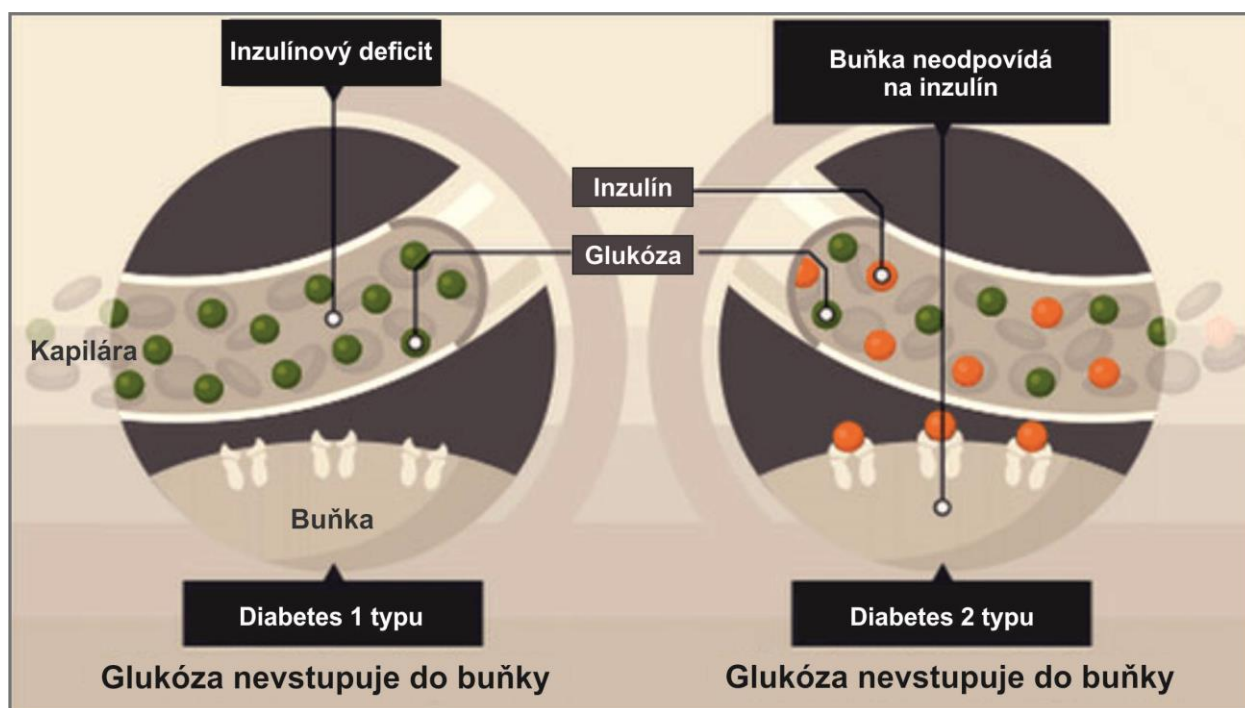
1.2.2 Diabetes mellitus I. typu

První skupinou je DM typu 1 (DM1), kterým trpí okolo 10% diabetiků. U pacientů je onemocnění vyvoláno absolutním nedostatkem insulinu způsobeným autoimunitní reakcí, při které dochází ke zničení β -buněk pankreatu (Foulis *et al.*, 1991) (Obr. 4). K destrukci buněk dochází různou rychlostí, u některých jedinců proběhne velmi rychle (zejména u dětí), u jiných k ní dochází postupně, během delšího časového úseku (především dospělí). V pozdní fázi onemocnění nedochází k žádné nebo téměř žádné sekreci inzulinu a pro pacienty je jeho

nahrazení synteticky vyráběným inzulínem životně důležité. Navíc mají pacienti s DM1 často predispozice ještě k dalším autoimunitním onemocněním (American Diabetes, 2015).

1.2.3 Diabetes mellitus II. typu

Nejčastější formou diabetu je DM typu 2 (DM2). Pacienti vykazují normální, později zvýšenou hladinu inzulínu, ale zároveň i vysokou hladinu glukózy v krvi (American Diabetes, 2015). To je zapříčiněno chronickou rezistencí k inzulínu, která je kompenzována jeho zvýšenou sekrecí (Kudva a Butler, 1997, Polonsky, 2000) (Obr. 4). Během progresu onemocnění dochází k postupnému vyčerpání a nadměrné apoptóze β -buněk pankreatu (Butler *et al.*, 2003). DM2 je často spojen s obezitou, nebo zvýšeným množstvím tělního tuku, které sami o sobě vyvolávají určitý stupeň inzulínové rezistence. Ta je z velké části léčitelná redukcí tělesné hmoty, pohybem, nebo farmaky, k terapii inzulínem se přikračuje v pokročilé fázi onemocnění (American Diabetes, 2015).



Obrázek 4 Srovnání příčin vzniku DM1 a 2. Na obrázku je znázorněna příčina vzniku DM1 (vlevo) a DM2 (vpravo). U DM1 dochází k trvalé inzulínové deficienci, kvůli čemuž glukóza nevstupuje do buňky. U DM2 dochází k defektům v odpovědi na vazbu inzulínu na receptor a následné signalizaci v důsledku čehož není glukóze umožněn vstup do buňky. (Upraveno podle URL1)

1.2.4 Gestační diabetes mellitus

Během těhotenství se u žen může projevit gestační diabetes mellitus (GDM). Ten je definován jako jakýkoliv stupeň glukózové intolerance poprvé objeven během těhotenství a po porodu z pravidla vymizí (American Diabetes, 2015). Tato intolerance může být dána působením placentárních hormonů a volného kortizolu (Kuhl, 1991), nedostatečným zvýšením sekrece inzulínu v průběhu těhotenství a poruchou funkce β -buněk pankreatu, která je způsobena dlouhodobou rezistencí k inzulínu. Ženy, které prodělaly GDM mají zvýšenou pravděpodobnost pozdějšího rozvoje DM (Buchanan a Xiang, 2005).

1.2.5 Specifické typy diabetu

Dalším typem diabetu spojeným s monogenetickými poruchami β -buněk pankreatu je tzv. maturity-onset diabetes of the young (MODY). Ten je vyvolán genetickými změnami. Dosud je jako původce identifikováno šest genů (např. geny rodiny *HNF* – *hepatocyte nuclear factor*) lokalizovaných na různých chromozomech. Změny v jejich expresi způsobují zejména defekty v sekreci inzulínu. Defekty v aktivitě inzulínu mohou být vyvolány mutacemi spojenými s inzulínovým receptorem, takto způsobený diabetes ovšem není běžnou formou a bývá průvodním symptomem komplexních onemocnění.

Diabetes může být způsoben i zraněním pankreatu a/nebo infekcí, které mohou vést k ovlivnění jeho funkce. To může být zapříčiněno i chronickým onemocněním jako je například cystická fibróza nebo hemochromatóza. Další možností vzniku defektů v sekreci inzulínu může být destrukce β -buněk pankreatu léčivy, nebo chemikáliemi (American Diabetes, 2014).

1.2.6 Léčba

Cílem léčby je udržet hladinu glykémie v optimální výšce bez výrazných výkyvů. Toho je u různých typů tohoto onemocnění dosahováno různými způsoby. Vzhledem k etiologii je jasné, že pacienti s DM1 jsou životně závislí na podávání terapeutického inzulínu. Dnes je využíváno humánního inzulínu, anebo kombinace dlouhodobě a krátkodobě působících inzulínových analog. Inzulín si pacienti aplikují v několika dávkách denně, aby se docílilo napodobení funkce zdravého pankreatu. Proto jsou rozděleny na dávky bazální a bolusy před jídlem. Výhodou je možnost využití inzulínové pumpy, která by měla co nejvěrněji simulovat fyziologický stav (American Diabetes, 2011).

U pacientů s DM2 se k léčbě onemocnění přistupuje jinak. Nejdříve jsou doporučovány perorální antidiabetika a změna životního stylu. Pouze v případě, že pacienti nedosahují cílových hladin glukózy v krvi, přistupuje se k intenzivnější léčbě, do které je zahrnuta i aplikace terapeutického inzulínu. Takováto terapie je pak vytvářena každému pacientovi na míru na základě hodnot glykémie a případného výskytu dalších patologických stavů, které DM doprovázejí (Inzucchi *et al.*, 2012).

Dále je potřeba bez ohledu na typ DM přistoupit k zásahům do životního stylu. K udržení správných hladin glykémie je potřeba zabezpečit správné složení přijímané potravy. To také zajistí, aby nedocházelo k nadměrným příbytkům na váze anebo v případě potřeby došlo jejímu snížení. Součástí této části terapie je i pravidelný pohyb. Ten mimo jiné snižuje riziko rozvoje kardiovaskulárních a dalších onemocnění, která DM často doprovázejí (American Diabetes, 2011).

Léčba již diagnostikovaného DM během těhotenství a nově zjištěného GDM je cílena podobně. Prioritou je optimalizovat glykémii a zamezit jejím dramatickým výkyvům (Hone a Jovanovic, 2010). Proto se i zde přistupuje k úpravě jídelníčku a míry fyzické aktivity (Bloomgarden *et al.*, 2010). V případě nutnosti medikace se přistupuje k podávání vybraných perorálních antidiabetik a/nebo aplikaci lidského inzulínu či inzulínových analog (Boinpally a Jovanovic, 2009, Hone a Jovanovic, 2010, Castorino a Jovanovic, 2011).

1.3 Diabetes mellitus v těhotenství

V současné době je až 10% těhotenství komplikováno DM (Int Assoc Diabet, 2010). S tím jsou spojovány různé komplikace. U takových těhotenství je až čtyřikrát zvýšené riziko spontánního potratu a děti diabetických matek mají až devětkrát častěji diagnostikovanou VV (Temple *et al.*, 2002). Účinného snížení výskytu malformací až o 8% u dětí žen trpících diabetem se dá docílit plánováním těhotenství (Evers *et al.*, 2004).

Jedním z rizikových faktorů doprovázející DM je obezita (Begum *et al.*, 2002, Calonge *et al.*, 2008, Castorino a Jovanovic, 2011), která je sama o sobě spojována se zvýšeným rizikem vzniku VV u plodu (Waller *et al.*, 1994, Queisser-Luft *et al.*, 1998, Cedergren a Kallen, 2003, Watkins *et al.*, 2003). Studie prokázaly, že kombinace těchto dvou negativních faktorů u těhotných žen ještě násobí riziko narození dítěte s VV (Anderson *et al.*, 2005) a že toto riziko stoupá úměrně s velikostí BMI matky (Moore *et al.*, 2000, Cedergren a Kallen, 2003).

1.3.1 Těhotenské a poporodní komplikace způsobené diabetem

Makrosomie a riziko porodu císařským řezem

Jedním z faktorů, který komplikuje těhotenství a porody diabetických matek je makrosomie (porodní váha vyšší než 4000g), jež představuje nebezpečí poranění matky i dítěte. Vyskytuje se až u třetiny těhotenství spojených s diabetem a nejrizikovější skupinou jsou matky s diagnostikovaným GDM komplikovaným obezitou (Spellacy *et al.*, 1985, Ehrenberg *et al.*, 2004b). Porody makrosomických dětí jsou spojeny s dalšími komplikacemi, jejichž riziko výskytu vzrůstá úměrně s vahou dítěte. Jednou z nich je dystokie ramen (zapříčení ramen dítěte za stydkou kostí), která se při porodní váze nad 5000g vyskytuje až 17,5krát častěji, než u dětí s normální porodní vahou a hrozí při ní další poranění dítěte (Spellacy *et al.*, 1985, Stotland *et al.*, 2004). Dalšími komplikacemi spojenými s makrosomií jsou tržné rány perinea, poporodní krvácení a chorioamnionitida, které jsou až sedmkrát, respektive dvakrát častější v posledních dvou případech (Stotland *et al.*, 2004).

Jednou z příčin výskytu makrosomických dětí může být vysoká hladina postprandiální glukózy v krvi. Pokud tato hladina překročí 6,13 mmol/l dochází ke glykosurii u plodu a když ten začne ve 20. týdnu těhotenství polykat amniotickou tekutinu přijímá i do ní vyloučenou glukózu. Takto přijatá glukóza vstřebaná střevním epitelem, může být mnohem účinnějším stimulačním faktorem k produkci inzulínu, než dočasně zvýšená glykémie a tento vyplavený inzulín pak působí jako růstový faktor (Combs *et al.*, 1992, Jovanovic, 2006).

V případě makrosomie je u diabetických matek diskutována zvýšená incidence porodu císařským řezem, pravděpodobně kvůli nutnosti zamezení výskytu porodních komplikací (Conway a Langer, 1998). Vyšší riziko porodu touto cestou je prokázáno zejména, pokud je diagnostikovaný DM spojen s nadváhou, vyšším věkem, nebo nutností medikace terapeutickým inzulínem (Naylor *et al.*, 1996, Remsberg *et al.*, 1999, Cundy *et al.*, 2000, Ehrenberg *et al.*, 2004a).

Růstové zpoždění

DM v těhotenství může mít i opačný efekt. U potomků matek s diabetem vyžadujícím léčbu inzulínem bylo sonograficky zjištěno růstové opoždění, které autoři shledali signifikantním. Tento jev pozorován častěji u dětí s VV, než u zdravých, ale rozdíl nebyl statisticky významný (Brown *et al.*, 1992). Růstové zpoždění u plodů diabetických matek pozorovali i v dalších studiích (Clausen *et al.*, 2005, Sharpe *et al.*, 2005) a uvádějí jeho výskyt až více než 1x častěji (Sharpe *et al.*, 2005).

Fetální a neonatální úmrtí

Úmrtí novorozenců matek s diagnostikovaným DM je 2,5 - 4krát častější. Pro fetální úmrtí je riziko vyšší dokonce 7krát. Důvodem jsou zejména malformace, což je i důvod, proč dochází k předčasným přerušením těhotenství, a syndrom dechové tísně (Cundy *et al.*, 2000, Platt *et al.*, 2002, Vaarasmaki *et al.*, 2002, Penney *et al.*, 2003, Evers *et al.*, 2004, Jensen *et al.*, 2004, Macintosh *et al.*, 2006). Cundy *et al.* (2002) a Clausen *et al.* (2005) odhalili vyšší riziko úmrtí pro potomky matek s diagnostikovaným DM2. Jako možné důvody uvádí nedostatečné plánování těhotenství (některé ženy o své nemoci ani nevědí) a horší kontrolu glykémie oproti ženám s DM1. Přispět mohou i další faktory, jako je vyšší věk matky, obezita a pozdější zjištění těhotenství (Cundy *et al.*, 2000).

Syndrom respirační tísně

Důvodem vzniku syndromu respirační tísně (RSD, Respiratory distress syndrome) je zejména nedostatek plicního surfaktantu a vysoký obsah tekutiny bohaté na proteiny, což znemožňuje úplné rozepnutí plic. K této komplikaci jsou náchylné zejména předčasně narozené děti a plody s defekty vývoje jícnu, u kterých dochází k fyzickému zamezení polykání plodové vody a následné respirační tísně (Moore a Persaud, 2002). Právě defekty jícnu jsou u dětí diabetických matek diagnostikovány ve zvýšené míře (viz kapitola 1.3.2, Defekty gastrointestinálního traktu). Zvýšená incidence RSD u potomků matek s DM byla pozorována v několika studiích (Vaarasmaki *et al.*, 2002, Jensen *et al.*, 2004).

Pre-eklampsie

Pre-eklampsie je stav, při kterém dochází k nedostatečnému roztažení cév dělohy, v důsledku nedokonalé invaze embryonálních cytotrofoblastů do stěny dělohy, kvůli čemuž nedochází k dostatečnému zásobení plodu kyslíkem a živinami. Proto je častým důvodem předčasného porodu (Powe *et al.*, 2011). U těhotenství komplikovaných DM je riziko vzniku této komplikace vyšší až 12krát a je dalším důvodem zvyšující incidence porodu císařským řezem a předčasného porodu (Ekblom *et al.*, 2001, Evers *et al.*, 2004, Clausen *et al.*, 2005).

1.3.2 Vývojové vady spojené s diabetem v těhotenství

Potomci diabetických matek jsou vystaveni riziku vzniku vývojových vad mnoha orgánových soustav. Toto riziko může být ještě ovlivněno dalšími faktory jako je například nadváha matky (Anderson *et al.*, 2005), dlouhodobé onemocnění DM již před porodem (Correa *et al.*, 2008) a možné zvýšení rizika může být i následkem nutnosti medikace v případě DM1 (Ferenc *et al.*, 2010). Míra výskytu VV se také může lišit mezi pohlavími, častěji byly

pozorovány u potomků mužského pohlaví (Platt *et al.*, 2002, Vaarasmaki *et al.*, 2002, Evers *et al.*, 2009).

Defekty centrální nervové soustavy

Až třikrát vyšší riziko vzniku VV u dětí diabetických matek v porovnání s normálními těhotenstvími je pro defekty centrální nervové soustavy (CNS) a čtyřikrát vyšší pro defekty neurální trubice (NT). Tyto vady jsou jedny z nejrizikovějších, protože jsou často neslučitelné se životem. Vadami, které byly u dětí pozorovány, jsou zejména anencefalie, hydrocefalus, holoprosencefalie a spina bifida (Martinez-Frias *et al.*, 1998, Farrell *et al.*, 2002, Evers *et al.*, 2004, Jensen *et al.*, 2004, Ray *et al.*, 2004, Anderson *et al.*, 2005, Nielsen *et al.*, 2005, Sharpe *et al.*, 2005, Macintosh *et al.*, 2006, Correa *et al.*, 2008, Ferenc *et al.*, 2010, Garne *et al.*, 2012). Konkrétní údaje jsou uvedeny v Tab. 1.

Za nejvíce rizikovou skupinu jsou podle některých studií označovány děti matek s pregestačním DM (Anderson *et al.*, 2005, Sharpe *et al.*, 2005, Macintosh *et al.*, 2006, Correa *et al.*, 2008) a zejména pokud je komplikovaný nadváhou (Anderson *et al.*, 2005). Zvýšený výskyt vad CNS je také pozorován v případě mnohonásobných defektů (Yang *et al.*, 2006, Correa *et al.*, 2008).

| Tabulka 1. Defekty centrální nervové soustavy (CNS) | | |
|---|---------------------------------------|---|
| Typ Vady | Maximální koeficient zvýšeného rizika | Studie |
| Defekty NT souhrnně | 4,2 | Martínez-Frías 1998, Evers 2004, Ray 2004, Nielsen 2005, Sharpe 2005, Macintosh 2006, Ferenc 2010, Garne 2012 |
| Anencefalie | 3,39 | Anderson 2005, Correa 2008 |
| Encefalokéla | 3,27 | Garne 2012 |
| Spina bifida | 1,21 | Anderson 2005, Correa 2008 |
| Defekty CNS souhrnně | 3,16 | Martínez-Frías 1998, Jensen 2004, Sharpe 2005, Macintosh 2006 |
| Holoprosencefalie | 32 | Martínez-Frías 1998, Anderson 2005, Correa 2008 |
| Hydrocefalus | 11,8 | Anderson 2005, Sharpe 2005, Correa 2008, Ferenc 2010, Garne 2012 |
| Mikrocefalie | 1,42 | Garne 2012 |

Tabulka 1 Defekty centrální nervové soustavy (CNS). V tabulce jsou uvedeny typy vad CNS s příslušnými koeficienty vyjadřujícími maximální míru rizika pro potomky matek s DM a příslušnými studiemi.

Defekty kardiovaskulární soustavy

Dalšími defekty, které se u dětí diabetických matek vyskytují až ve 4,5krát zvýšené míře, jsou defekty kardiovaskulární soustavy (KVS). Nejčastějšími defekty jsou hypertrofická kardiomyopatie, defekty síňových a komorových sept a anomálie v napojení plicních žil (Martínez-Frías *et al.*, 1998, Farrell *et al.*, 2002, Platt *et al.*, 2002, Penney *et al.*, 2003, Evers *et al.*, 2004, Jensen *et al.*, 2004, Nielsen *et al.*, 2005, Sharpe *et al.*, 2005, Macintosh *et al.*, 2006, Frías *et al.*, 2007, Correa *et al.*, 2008, Evers *et al.*, 2009, Ferenc *et al.*, 2010, Garne *et al.*, 2012). Podrobné údaje jsou uvedeny v Tab. 2.

Podobně jako u vad CNS bylo pozorováno vyšší riziko pro potomky matek s pregestačním DM (Correa *et al.*, 2008) zejména s DM1 (Ferenc *et al.*, 2010). Evers *et al.* (2004) a Vaarasmaki *et al.* (2002) navíc pozorovali více VV u potomků mužského pohlaví.

| Tabulka 2. Defekty kardiovaskulární soustavy (KVS) | | |
|--|---------------------------------------|--|
| Typ Vady | Maximální koeficient zvýšeného rizika | Studie |
| Defekty KVS souhrnně | 4,64 | Martínez-Frías 1998, Vaarasmaki 2002, Jensen 2004, Evers 2004, Nielsen 2005, Sharpe 2005, Macintosh 2006, Correa 2008, Evers 2009, Ferenc 2010, Garne 2012 |
| Hypertrofická kardiomyopatie | 61,6 | Frías 2007 |
| Defekty septa síní | 8,8 | Correa 2008, Garne 2012 |
| Anomálie v napojení plicních žil | 7,12 | Correa 2008 |
| Fallotova tetralogie | 4,89 | Correa 2008, Garne 2012 |
| Transpozice velkých cév | 3,64 | Sharpe 2005, Correa 2008, Garne 2012 |
| Defekty komorového septa | 2,89 | Penney 2003, Correa 2008, Garne 2012 |
| Zúžení plicní chlopně | 2,41 | Correa 2008, Garne 2012 |

Tabulka 2 Defekty kardiovaskulární soustavy (KVS). V tabulce jsou uvedeny typy vad KVS s příslušnými koeficienty vyjadřujícími maximální míru rizika pro potomky matek s DM a příslušnými studiemi.

Defekty vylučovací soustavy

Zvýšené riziko abnormálního vývoje orgánů vylučovací soustavy (VS) je také spojováno s DM během těhotenství. Nejvyšší riziko je pro vznik hypospádie (neúplné vytvoření močové trubice), značně vysoké je však i pro závažnější defekt, kterým je ageneze či dysgeneze ledvin. Dalším pozorovaným defektem byla dysplázie ledvin (Martinez-Frias *et al.*, 1998, Farrell *et al.*, 2002, Vaarasmaki *et al.*, 2002, Jensen *et al.*, 2004, Ray *et al.*, 2004, Nielsen *et al.*, 2005, Sharpe *et al.*, 2005, Macintosh *et al.*, 2006, Frias *et al.*, 2007, Correa *et al.*, 2008, Evers *et al.*, 2009, Davis *et al.*, 2010, Ferenc *et al.*, 2010, Garne *et al.*, 2012) (viz. Tab. 3).

I v případě těchto defektů pozorujeme větší incidenci u potomků matek s pregestačním DM (Frias *et al.*, 2007, Correa *et al.*, 2008) a u potomků mužského pohlaví (Vaarasmaki *et al.*, 2002, Evers *et al.*, 2009).

| Tabulka 3. Defekty vylučovací soustavy (VS) | | |
|---|---------------------------------------|--|
| Typ Vady | Maximální koeficient zvýšeného rizika | Studie |
| Defekty VS souhrnně | 4,3 | Martínez-Frías 1998, Vaarasmaki 2002, Evers 2004, Jensen 2004, Ray 2004, Nielsen 2005, Sharpe 2005, Macintosh 2006, Evers 2009, Garne 2012 |
| Hypospádie | 18,73 | Nielsen 2005, Sharpe 2005, Correa 2008, Ferenc 2010, Garne 2012 |
| Ageneze/dysgeneze ledvin | 14,8 | Nielsen 2005, Sharpe 2005, Correa 2008, Davis 2010, Ferenc 2010, Garne 2012 |
| Dysplázie ledvin | 5,13 | Frías 2007, Garne 2012 |

Tabulka 3 Defekty vylučovací soustavy (VS). V tabulce jsou uvedeny typy vad VS s příslušnými koeficienty vyjadřujícími maximální míru rizika pro potomky matek s DM a příslušnými studiemi.

Defekty gastrointestinálního traktu

V případě defektů gastrointestinálního traktu (GIT) je za nejrizikovější považována anorektální atřezie, která se u potomků matek s DM vyskytuje až 8krát častěji (Martinez-Frias *et al.*, 1998, Vaarasmaki *et al.*, 2002, Sharpe *et al.*, 2005, Macintosh *et al.*, 2006, Frias *et al.*, 2007, Correa *et al.*, 2008, Ferenc *et al.*, 2010, Garne *et al.*, 2012). Mezi pozorovanými defekty byly dále střevní atřezie a atřezie jícnu, podrobně v Tab. 4.

| Tabulka 4. Defekty gastrointestinálního traktu (GIT) | | |
|--|---------------------------------------|--|
| Typ Vady | Maximální koeficient zvýšeného rizika | Studie |
| Defekty GIT souhrnně | 1,1 | Vaarasmaki 2002, Sharpe 2005, Macintosh 2006, Garne 2012 |
| Anorektální atřezie | 8,22 | Martínez-Frías 1998, Sharpe 2005, Frías 2007, Correa 2008, Ferenc 2010, Garne 2012 |
| Střevní atřezie | 3,59 | Martínez-Frías 1998, Frías 2007, Correa 2008, Ferenc 2010 |
| Antrézie jícnu | 2 | Martínez-Frías 1998, Sharpe 2005, Frías 2007, Correa 2008, Ferenc 2010, Garne 2012 |

Tabulka 4 Defekty gastrointestinálního traktu (GIT). V tabulce jsou uvedeny typy vad GIT s příslušnými koeficienty vyjadřujícími maximální míru rizika pro potomky matek s DM a příslušnými studiemi.

Defekty kosterní soustavy

Na zvýšenou incidenci defektů kosterní soustavy v případě těhotenství komplikovaným DM ukazují mnohé studie (Martinez-Frias *et al.*, 1998, Vaarasmaki *et al.*, 2002, Penney *et al.*, 2003, Jensen *et al.*, 2004, Nielsen *et al.*, 2005, Sharpe *et al.*, 2005, Macintosh *et al.*, 2006, Correa *et al.*, 2008, Evers *et al.*, 2009, Ferenc *et al.*, 2010, Garne *et al.*, 2012). Mezi pozorované VV patří defekty ve vývoji kaudální části, zejména syndrom kaudální regrese, který je více než 26krát častější při srovnání s normálními těhotenstvími, dále orofaciální rozštěpové vady, defekty končetin a polydaktylie, či syndaktylie. Konkrétní údaje jsou uvedeny v Tab. 5.

Farrel *et al.* 2002 pozoroval vyšší incidenci u potomků mužského pohlaví a vyšší riziko bylo zaznamenáno u potomků matek s pregestačním DM (Frias *et al.*, 2007, Correa *et al.*, 2008) a to zejména v kombinaci s dalšími defekty (Correa *et al.*, 2008).

| Tabulka 5. Defekty Kosterní soustavy (KS) | | |
|---|---------------------------------------|--|
| Typ Vady | Maximální koeficient zvýšeného rizika | Studie |
| Defekty KS souhrnně | 1,7 | Vaarasmaki 2002, Jensen 2004 |
| Kaudální dysgeneze/ syndrom kaudální regrese | 26,4 | Martínez-Frías 1998, Penney 2003, Correa 2008, Evers 2009, Garne 2012 |
| Rozštěp rtu a/nebo patra | 10,73 | Martínez-Frías 1998, Nielsen 2005, Sharpe 2005, Macintosh 2006, Correa 2008, Ferenc 2010, Garne 2012 |
| Defekty končetin | 9,22 | Martínez-Frías 1998, Sharpe 2005, Macintosh 2006, Correa 2008, Ferenc 2010, Garne 2012 |
| Sirenomelie | 8,73 | Garne 2012 |
| Polydaktylie/syndaktylie | 3,62 | Martínez-Frías 1998, Penney 2003, Nielsen 2005, Frías 2007, Ferenc 2010, Garne 2012 |
| Košská noha | 0,9 | Nielsen 2005, Ferenc 2010, Garne 2012 |

Tabulka 5 Defekty kosterní soustavy (KS). V tabulce jsou uvedeny typy vad CNS s příslušnými koeficienty vyjadřujícími maximální míru rizika pro potomky matek s DM a příslušnými studiemi.

Další defekty spojované s diabetem

Dalšími defekty spojovanými s DM v těhotenství jsou defekty ve vývoji thymu (Frias *et al.*, 2007), heterotaxe (Frias *et al.*, 2007, Correa *et al.*, 2008), defekty ucha (Ferenc *et al.*, 2010), omfalokéla (Martinez-Frias *et al.*, 1998, Correa *et al.*, 2008, Garne *et al.*, 2012), defekty oka (Martinez-Frias *et al.*, 1998, Macintosh *et al.*, 2006, Correa *et al.*, 2008, Garne *et al.*, 2012) a nesestoupení varlat (Nielsen *et al.*, 2005, Ferenc *et al.*, 2010). Míra zvýšení rizika je uvedena v Tab. 6.

| Tabulka 6. Další defekty potomků matek s DM | | |
|---|---------------------------------------|---|
| Typ Vady | Maximální koeficient zvýšeného rizika | Studie |
| Aplázie/hypoplázie thymu | 29,62 | Frías 2007 |
| Heterotaxe | 7,48 | Frías 2007, Correa 2008 |
| Defekty ucha | 2,4 | Ferenc 2010 |
| Omfalokéla | 2,32 | Martínez-Frías 1998, Correa 2008, Garne 2012 |
| Defekty oka | 1,45 | Martínez-Frías 1998, Macintosh 2006, Garne 2012 |
| Anotie/mikrotie | 3,75 | Correa 2008, Garne 2012 |
| Nesestoupení varlat | 0,7 | Nielsen 2005, Ferenc 2010 |

Tabulka 6 Další defekty potomků matek s DM. V tabulce jsou uvedeny další defekty pozorované u dětí matek s DM s příslušnými koeficienty vyjadřujícími maximální míru rizika pro potomky matek s DM a příslušnými studii.

1.3.3 Možné mechanismy vzniku vývojových vad

Hyperglykémie

Hyperglykémie je z důvodu poruchy glukózového metabolismu jedním z projevů DM. Při testování na laboratorních zvířatech bylo zjištěno, že právě to je jedna z možných příčin vzniku VV. Fine *et al.* (1999) testovali vliv zvýšené hladiny glukózy na myším modelu a to jak na tkáňových kulturách, tak březích samicích. Došli k závěru, že v důsledku vysokých hladin glukózy dochází ke snížení exprese genu *Pax-3* (*Paired box 3*). Tento DNA vazebný protein je exprimován specificky v buňkách vyvíjející se NS. Zejména v buňkách neurální lišty (Goulding *et al.*, 1991), které kolonizují např. vyvíjející se srdce (Conway *et al.*, 1997) a dále v buňkách mezenchymu končetinových pupenů (Goulding *et al.*, 1991). V důsledku redukce exprese genu *Pax-3* dochází k apoptóze buněk a tím vzniku defektů NT (Phelan *et al.*, 1997, Fine *et al.*, 1999) a KVS (Kumar *et al.*, 2007) odpovídající defektům pozorovaným u člověka.

Bmp-4 (*Bone morphogenetic protein*) je dalším důležitým genem, který je ovlivnitelný vysokými hladinami glukózy (Fu *et al.*, 2006). *BMP* rodina všeobecně zahrnuje klíčové faktory účastníci se např. formace neurální lišty a následně neurální trubice (Liu a Niswander, 2005). Nadměrná exprese *Bmp-4*, ke které dochází pod vlivem vysoké glykémie, potom vede ke snížené schopnosti proliferace, diferenciaci a zvýšené míře apoptózy (Fu *et al.*, 2006). Na kuřecím a myším modelu bylo prokázáno, že důsledkem změn v expresi *Bmp-4* jsou defekty v uzavírání NT (Eom *et al.*, 2011) a KVS (Kumar *et al.*, 2007).

Pozitivní ovlivnění exprese *Shh* (*sonic hedgehog*) vede k defektům ve vývoji CNS (Liao *et al.*, 2004). Tento morfogen je dalším z faktorů podílejících se na formaci a vzniku neurální

soustavy (Ericson *et al.*, 1995). Fu *et al.* (2006) na myším modelu prokázali, že i exprese *Shh* je ovlivnitelná vysokou glykemií a indukuje změny v proliferaci a diferenciaci buněk NT.

Negativní vliv zvýšené hladiny glukózy v krvi potvrzuje i studie Rudge *et al.* (2000). Ti odhalili, že morbidita a mortalita potomků žen trpících trvale zvýšenou glykemií, ale ne DM je až 10 krát vyšší při srovnání s kontrolní skupinou, což shledali srovnatelným s výsledky pozorovanými u žen, které mají DM diagnostikovaný.

Zvýšená míra oxidativního stresu

Nesrovnalosti, v metabolickém aparátu mateřského organismu, jako je například hypoxie (Li *et al.*, 2005), dlouhodobá cévní onemocnění a nefropatie (Kaaaja, 2011) vychylují rovnováhu v metabolismu zárodku. To vyvolává oxidativní stres u zárodku, který vyúsťuje v ovlivnění exprese genu *Pax-3* (Li *et al.*, 2005), což má za následek nestandardní ovlivnění buněk specifických populací tvořící základy NT a KVS a abnormální vývoji zárodku (Phelan *et al.*, 1997, Fine *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2005, Kumar *et al.*, 2007).

Tento fakt potvrzuje studie, kterou provedl Kumar *et al.* (2007), kde odhalili, že se částečně dá vadám vyvolaným tímto mechanismem předejít podáním vitamínu E s antioxidačními účinky, který u diabetických krys prokazatelně snížil incidenci VV spojovanou se zvýšeným oxidativním stresem.

Aplikace terapeutického inzulínu

Na možný embryotoxický účinek inzulínu poukazuje studie provedená v roce 1950 na kuřecím zárodku. Po aplikaci zvířecího inzulínu do žloutku vyvíjejícího se zárodku byly pozorovány defekty jako spina bifida, poškození obratlů, defekty ve vývoji zobáku a drápů, dále inzulín vyvolal nestandardní osifikaci a defekty končetin (Duraishwami, 1950). Tyto výsledky podporuje i další studie, ve které po aplikaci zvířecího inzulínu pozorovali u kuřecího embrya podobné vady. Mezi nimi se vyskytovaly abnormality ve vývoji kaudální části, vysoká mortalita, deformace končetin a kraniální oblasti (Julian a Abbott, 1998).

Tyto studie využívaly k testování zvířecí (vepřový nebo hovězí) inzulín, dnes je ovšem k léčbě těhotných žen doporučováno užívat inzulín lidský, nebo inzulínová analoga (Boinpally a Jovanovic, 2009, Hone a Jovanovic, 2010, Castorino a Jovanovic, 2011). Vzhledem k biologické aktivitě inzulínu a jeho schopnosti ovlivňovat expresi velkého množství proteinů zahrnutých v metabolických drahách, sekreci hormonů, a v neposlední řadě také transkripčních faktorů (Obrien a Granner, 1991), je otázkou, zda se na abnormálním vývoji zárodků diabetických matek částečně nepodílí také.

Genetické faktory

V případě specifického diabetu MODY jsou nejznámější formy vyvolány mutací v rodině genů *HNF* (*Hepatocyte nuclear factor*). Jedním z genů, jehož exprese je díky mutaci ovlivněna je *HNF1 β* (Fajans *et al.*, 2001). Ten se podílí na vývoji jater, ledvin, plic, a pankreatu během časně embryogeneze (Coffinier *et al.*, 1999). Právě tato mutace je spojována s VV vylučovací soustavou (Haumaitre *et al.*, 2006). Vzhledem k tomu, že mnoho pacientů s MODY je dodnes špatně klasifikováno jako pacienti s DM1 nebo 2 (Siddiqui *et al.*, 2015) a nejsou v souhrnných studiích hodnoceni zvlášť, může být i toto důvod, proč jsou vady VS u potomků matek diabetické populace všeobecně častější.

1.4 Inzulín

Inzulín je klíčovým a jediným faktorem snižujícím glykémii. Zvyšuje transport glukózy do buněk cílových tkání, zejména tedy do svalových, jaterních a tukových a je produkován β -bunčkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Polypeptidová molekula je syntetizována v endoplazmatickém retikulu ve formě pro-inzulínu, který je v granulech β -buněk následně štěpen na dvě části, C-peptid a vlastní aktivní inzulín. Oba úseky jsou následně uvolňovány do krevního řečiště. Aktivní molekula inzulínu je sestavena ze dvou polypeptidových řetězců vzájemně propojených dvěma disulfidickými můstky (obr. 5), C-peptid je doména umožňující vznikajícímu polypeptidu zaujmout správnou konformaci.

K uvolnění do krevního řečiště dochází při vzestupu hladiny krevní glukózy nad 5,5mmol/l. Stálou sekrecí je udržována bazální hladina 70pmol/l, po postprandiální stimulaci sekrece glukózou jeho množství stoupá až na 700pmol/l. Inzulín je vázán na inzulínové receptory, které jsou složeny z α a β podjednotky, z nichž β podjednotka má kinázovou aktivitu. Díky této aktivitě dochází k vzájemné fosforylaci cytosolických domén a spuštění dalších signalizačních procesů, co má za následek zvýšení počtu glukózových kanálů v buněčné membráně a zvýšení odběru glukózy z krevního řečiště (Ganong, 1995, Trojan, 2003).

Deficit inzulínu způsobuje patologické stavy způsobené abnormalitami v biochemickém metabolismu, které vyúsťují v komplexní onemocnění nazývané Diabetes Mellitus (DM). Tento deficit může být relativní, nebo absolutní a v jeho důsledku dochází ke snížení respektive znemožnění vstupu glukózy do periferních tkání a hyperglykémii (American Diabetes, 2015) (více viz. kapitola 1.2 Diabetes mellitus).

1.4.1 Terapeutický inzulín

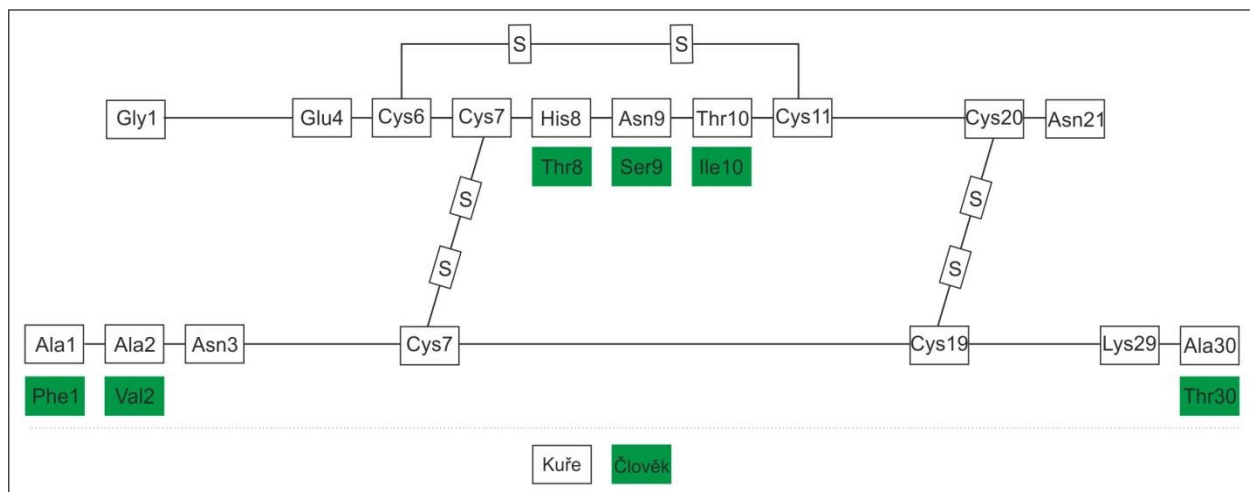
Jako první se v léčbě diabetiků využíval zvířecí inzulín. Konkrétně inzulín izolovaný ze slinivky hovězího dobytka (liši se od lidského ve třech aminokyselinách) a vepřů (od lidského se liší pouze v jedné aminokyselině). Aplikaci zvířecího inzulínu ovšem v určitém procentu případů komplikovaly alergické reakce nebo zánětlivé reakce v místě vpichu. Vedlejší účinky zejména proti hovězímu inzulínu, se také projevovaly inzulínovou rezistencí. Se zdokonalením metod čištění inzulínu se podařilo většinu komplikací minimalizovat, i přes to se ale dnes zvířecí inzulín k léčbě DM prakticky nepoužívá (Berger *et al.*, 1995, Perušičová, 2006a).

Nahrazení zvířecího inzulínu v terapii umožnila biosyntéza lidského inzulínu. Nejenom díky tomu, že jeho podávání nevolávalo tolik komplikací ale také díky tomu, že humánní inzulín je vstřebáván z podkoží rychleji a proto se zmenšily i potřebné denní dávky. Humánní inzulín je vyráběn dvěma způsoby. První je úprava vepřového inzulínu na lidský a druhý 100% syntetická výroba bakteriemi *Escherichia coli* nebo *Sacharomyces cerevisiae*, po vpravení specifické sekvence pro tvorbu inzulínu do DNA (Perušičová, 2006b, Brož, 2015).

Aby byl co nejlépe napodoben fyziologický profil produkce inzulínu, byla vyvinuta inzulínová analoga. Jejich struktura je chemicky pozměněna tak, aby získala výhodnější terapeutické vlastnosti. Proto máme na výběr dlouhodobě a krátkodobě působící analoga, která se podávají jako náhrada bazální sekrece inzulínu, respektive jako náhrada bolusového inzulínu vyplavovaného na základě stimulace sekrece glukózou po jídle (Perušičová, 2006c, Brož, 2015).

1.4.2 Kuřecí inzulín

Kuřecí inzulín je stejně jako savčí formován v endoplazmatickém retikulu jako proinzulín, teprve v golgiho aparátu podléhá štěpení a stává se z něj biologicky aktivní molekula. Stejně jako u člověka je to dvojitý polypeptidový řetězec propojený dvěma disulfidickými můstky. Kuřecí inzulín se od lidského liší v 6 aminokyselinách (obr. 5), což není větší odchylka, než je běžné mezi savčími inzulíny navzájem a jeho biologická aktivita je s nimi srovnatelná (Sturkie *et al.*, 1986).



Obrázek 5 Srovnání struktury lidského a kuřecího inzulínu. Bíle jsou znázorněny vybrané aminokyseliny kuřecího inzulínu, zeleně aminokyseliny lidského inzulínu v místech, kde se od kuřecího liší (upraveno podle Sturkie *et al.*, 1986).

2 Cíle práce

Onemocnění diabetes mellitus se stává stále se zvětšujícím problémem, který si žádá své řešení. Počet jedinců v populaci s tímto onemocněním permanentně stoupá a dlouhodobé odhady naznačují, že by se jejich počet mohl do roku 2030 až zdvojnásobit. S ohledem na výskyt tohoto onemocnění u žen v reprodukčním věku, je nutné brát v potaz možné ovlivnění vývoje plodu jak nemocí samotnou, tak léčbou, kterou pacientky vyžadují i během těhotenství.

Prospektivní studie poukazují na fakt, že potomci matek s diabetem v těhotenství vykazují vyšší procento výskytu vývojových vad než je tomu u dětí pocházejících z fyziologických těhotenství. Je proto nutné co nespolehlivěji určit škodlivé faktory, které jsou za vyvolání vad zodpovědné, aby se jim dalo co nejefektivněji předcházet. Jedním z možných vlivů, kterému mohou být potomci diabetických matek vystaveni je kromě výkyvů v hladině krevního cukru také léčba této nemoci za pomoci inzulínu, která je zejména pro pacientky s diabetem prvního typu životně důležitá. V diplomové práci jsem se proto rozhodla objasnit hypotézu, zda může inzulín sám ovlivnit vývoj plodu. Mezi vadami pozorovanými u potomků diabetických matek jsem se zaměřila především na možnost vzniku syndromu kaudální regrese, který se vyskytuje u dětí matek s diabetem v těhotenství až 26krát častěji.

1. Ověřit za pomoci *in vitro* metody SANDWICH na kuřecím modelu, zda humánní inzulín podávaný v těhotenství může zvyšovat riziko vzniku vývojových vad, růstové retardace a zárodečné smrti.
2. Ověřit za pomoci *in vitro* metody SANDWICH na kuřecím modelu, zda inzulín podávaný v těhotenství může ovlivnit vývoj kaudální části zárodku.
 - V případě potvrzení předchozího cíle se pokusit objasnit jakými mechanismy dochází k vyvolání tohoto defektu.
 - Ověřit, v jakém ED je po vystavení vlivu teratogenu *in vitro* metodou SANDWICH vhodné provádět měření kaudální části zárodku kuřete.
3. Porovnáním s metodou CHEST ověřit senzitivitu *in vitro* metody SANDWICH.

Materiál

2.1 Modelový organismus

Jako modelový organismus jsme využívali zárodky Kuru domácího (*Gallus gallus*), konkrétně masný typ COBB 500 (Obr. 6). Vejce jsme odebírali od firmy XAVERgen a.s. z líhně Habry, kde jsou slepice chovány volně v halách na podestýlce. Odebírali jsme oplozená násadová vejce ve stadiu ED0, ve kterém byla do počátku pokusu uchována pomocí zchlazení na 15°C.



Obrázek 6 Kur domácí (*Gallus gallus*), masný typ COBB 500 (upraveno podleURL2)

2.2 Inzulín

K testování jsme používali lidský inzulín Insuman[®] Basal v injekční suspenzi od firmy Sanofi aventis. Testované koncentrace se pohybovaly v rozmezí 10^{-7} g/ml až 10^{-4} g/ml .

3 Metody

3.1 SANDWICH

Sandwich je metoda vyvinuta v naší laboratoři, umožňující zkoumat chronickou expozici zárodku teratogenu. Zárodek je vyjmut ze svého přirozeného prostředí a přenesen do Petriho misky s živným médiem, do kterého je přidána námi sledovaná látka. *In vitro* je pak zárodek inkubován při 37,5°C. Pro pokus bylo modifikováno složení živného média, používaného na kultivaci myších buněk zubního epitelu a mezenchymu (Hu *et al.*, 2005).

3.1.1 Kultivace embryí před pokusem

Oplozená vejce byla do doby, než byla uvedena do pokusu udržována v teplotě 15°C. Po té nasazena v mřížkách do inkubátoru (Gallenkamp plus II), kde jsme je kultivovali při teplotě 37,5°C. Na příslušném embryonálním dni (v našem případě ED2, tedy po 48 hodinách) jsme z vajec zárodky vyjmuli a přenesli do *in vitro* systému.

3.1.2 Příprava živného média

Živné médium jsme připravovali vždy čerstvé v den pokusu. Pracovali jsme sterilně v laminárním boxu (Jouan MSC 12). Množství živného média odpovídá množství potřebnému pro inkubaci 10 zárodků.

A. Složení živného média

- 40 ml média DMEM/F (Sigma-Aldrich) nebo BGJb (Gibco)
- 10 ml FBS (Sigma-Aldrich)
- 500 µl vitaminu C (Sigma-Aldrich)
- 500 µl Gentamycinu (Sigma-Aldrich)
- 500 µl L-glutaminu (Sigma-Aldrich)

B. Médium jsme promíchali a přefiltrovali.

C. Základní roztok jsme vložili do inkubátoru (Sanyo, model MCO-5M) vyhřátého na 37,5°C, kde jsme ho nechali minimálně 30 min. Pokud bychom médium dostatečně neprohřáli, mohlo by po přidání agarózy dojít k jejímu vysrážení.

D. Během prohřívání základního roztoku jsme si připravili agar:

- 10 ml injekční vody (BBraun)

- 350 mg Agarózy (Agarose, low gelling temperature; Sigma-Aldrich)
- E. Přidali jsme agar do prohřátého základního roztoku v poměru 1 ml agaru na 10 ml média.
- F. Testovanou látku jsme do média přidávali až těsně před nanesením na Petriho misky.
- G. Na každou misku jsme napipetovali 5 ml média s konkrétní koncentrací testované látky (inzulín v koncentracích 10^{-7} mg/ml, 10^{-6} mg/ml, 10^{-5} mg/ml nebo 10^{-4} mg/ml) popřípadě bez ní.
- H. Médium se nechalo na miskách zatuhnout při teplotě 6-7°C.

3.1.3 Příprava pracovní plochy

- A. Do kádinky jsme připravili 70% etanol, který sloužil ke sterilizaci nástrojů mezi jednotlivými přeneseními zárodků na médium.
- B. Rozehřáli jsme histologickou plotýnku (Vezas VD-1n) na 30 - 35°C a vložili na ni 10 cm Petriho misku s BGJb médiem určeným k oplachování zárodku před přenesením na agarové médium.

3.1.4 Přenesení zárodků do *in vitro* systému

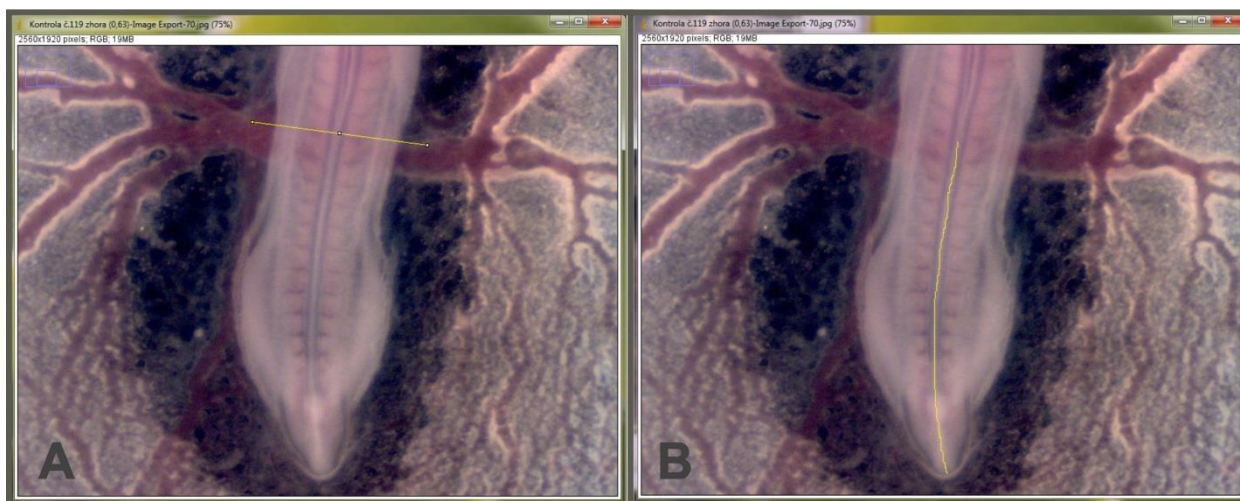
Zárodky jsme přesouvali semisterilně. Vždy v čistém laboratorním oblečení a chirurgické roušce. Obrazová dokumentace postupu je v příloze (8.1).

- A. Vejce byla inkubována až do ED 2 (viz. kapitola 3.2.1)
- B. Po cca 48 hodinách byla vejce postupně vyjmuta z inkubátoru a rozklepnuta o dno Petriho misky tak, aby se zárodek nacházel co nejvíce ve středu na povrchu žloutkového vaku.
- C. Zárodek byl prohlédnut pod stereomikroskopem (Leica MZ6), aby se zjistilo, zda není spontánně malformovaný nebo mrtvý a abychom mohli určit vývojové stadium podle Hamburgera a Hamiltona (Hamburger a Hamilton, 1951).
- D. Spontánně malformované, nebo mrtvé zárodky byly vyřazeny. Do studie jsme použili pouze zárodky ve stadiu 12 – 13+ HH.
- E. Na hrdlo Erlenmeyerovy baňky jsme položili kroužek z filtračního papíru.
- F. Druhý kroužek z filtračního papíru jsme položili na povrch žloutkového vaku tak, aby byl zárodek co nejvíce ve středu.

- G. Za pomoci pinzety a nůžek jsme kroužek z filtračního papíru obstříhli a nadzdvihli – čímž jsme dosáhli toho, že jsme v pinzetě drželi zárodek na žloutkové membráně, který byl přilepen ke kroužku.
- H. Po té jsme celý tento systém – kroužek a zárodek na žloutkové membráně přenesli na druhý kroužek, který byl připravený na Erlenmeyerově baňce. Tím nám vznikl „sandwich“ (první kroužek filtračního papíru, zárodek na žloutkové membráně, druhý kroužek filtračního papíru).
- I. Sandwich jsme potom opláchli v BGJb médiu nahřátém na 30 – 35°C. Nahřátém proto, abychom zárodek nevystavovali teplotnímu šoku.
- J. Po té jsme zárodek vložili na živné médium, vyhřáté na stejnou teplotu. Pokládali jsme jej opatrně, aby mezi „sandwichem“ a médiem nevznikaly bubliny, které by mohly ovlivnit vývoj zárodku.
- K. Živné médium obsahovalo inzulin v koncentracích 10^{-7} mg/ml, 10^{-6} mg/ml, 10^{-5} mg/ml nebo 10^{-4} mg/ml (kontrolní zárodky jsme inkubovali na médiu bez inzulinu).
- L. Petriho misku jsme přiklopili víčkem a vložili do inkubátoru (Sanyo, model MCO-5M) vyhřátého na 37,5°C.

3.1.5 Sledování a vyhodnocení pokusu

- A. Zárodky byly každý den prohlíženy a kontrolovány po dobu 2 dnů (tzn. každých cca 24 a 48 hodin po aplikaci)
- B. Případná úmrtí, nebo viditelné změny a abnormality se zaznamenávaly do protokolu.
- C. Zároveň byla pořizována obrazová fotodokumentace (Carl Zeiss Axiocam 105 color), která také sloužila k dalšímu vyhodnocení experimentu.
- D. Pokus jsme vyhodnocovali ve 3 a 4ED. Každý zárodek byl prohlédnut, abychom zjistili případné VV a každému zárodku byla v programu ImageJ změřena kaudální část a to od místa, kde vitelinní cévy protínají strukturu neurální trubice až ke konci zárodku (viz Obr. 7).



Obrázek 7 Měření kaudální části zárodku v programu **ImageJ**. Na obr. A vidíme vyznačení průběhu vitelinních cév (žlutá čára), na obr. B potom vyznačení celé měřené délky kaudální části (žlutá čára).

3.2 Statistické zpracování dat

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism 6. K ověření normality dat jsme použili Shapiro-Wilk test normality. Data jsme pak analyzovali pomocí Mann-Whitney neparametrického testu. Hranice statistické významnosti byla $P < 0,05$.

3.3 Detekce apoptózy

Apoptózu jsme zjišťovali metodou TUNEL, která umožňuje detekci apoptotických buněk a tělísek, díky odhalení a naznačení fragmentované DNA, která je výsledkem signálních drah vedoucích k apoptóze. V této práci jsme využili ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore) a DAB substrate kit for peroxidase (Vector laboratories), které obsahují všechny komponenty k detekci potřebné.

3.3.1 Histologické zpracování tkáně

Fixace

- A. 12-24 hod PFA (Penta)
- B. 2x Promýt 1x PBS (Sigma-Aldrich)
- C. 70% etanol (Penta)

Zalítí do parafinu

V této metodě jsme používali roztoky, do kterých nebyly zalévány vzorky fixované jinak, než v PFA.

- A. 3x 30 min 80% etanol (Penta)
- B. 3x 20 min 96% etanol (Penta)
- C. 3x 20 min 100% etanol (Penta)
- D. 2x 1 min Toluén (Penta)
- E. 2x 30 min parafín teplota tání 54°C (Sigma-Aldrich)
- F. 2x 1 hod parafín teplota tání 58°C (Sigma-Aldrich)
- G. Vzorky jsme nechali přes noc v termostatu, druhý den tkáň naorientovali a po zatuhnutí parafínu vytvořili histologický bloček.

Krájení a lepení na sklíčka

- A. Parafínové bločky jsme krájeli na mikrotomu (Leitz Weltzar 1212 Mintor) na tloušťku 10 µm.
- B. Řezy jsme lepili na podložní skla Superfrost/plus (P-lab).
- C. Pod řezy jsme injekční stříkačkou nakapali roztok Tweenu (Sigma-Aldrich) a dH₂O a sklo vložili na vyhřátou mikroskopickou plotýnku (Vezas DV-1n).
- D. Po napnutí jsme dali parafínové řezy inkubovat přes noc do termostatu (Biological thermostat BT 120M) při teplotě 35°C.

3.3.2 Imunohistochemie

TUNEL

- A. 2x 3 min xylen (Penta)
- B. 3 min 100% etanol (Penta)
- C. 3 min 96% etanol (Penta)
- D. 3 min 70% etanol (Penta)
- E. 3 min depcH₂O
- F. 15 min ProteinázaK (50 µl Proteinázy K (Sigma-Aldrich) v koncentraci 20mg/ml + 50 ml 1xPBS (Gibco))
- G. 2x 3 min depcH₂O
- H. 5 min 3% H₂O₂ (Penta)
- I. 2x 5 min 1x PBS (Gibco)
- J. minimálně na 10 sec 75 µl Equilibration bufferu na každé sklíčko

- K. 1 hod reakční enzym (38,5 μ l Reaction bufferu + 16,5 μ l TdT Enzymu na každé sklíčko), skla jsme zakryli parafilmem a inkubovali ve vlhké komůrce
- L. 10 min Stop buffer (68 ml depcH₂O + 2 ml Stop/Wash bufferu do kyvety)
- M. 3x 1 min 1x PBS (Gibco)
- N. 30 min 65 μ l protilátky na každé sklíčko, skla jsme zakryli parafilmem a inkubovali ve vlhké komůrce
- O. 3x 1 min 1x PBS
- P. 500 μ l DAB solution (5 μ l depcH₂O + 2 kapky Buffer stock solution + 4 kapky DAB + 2 kapky H₂O₂ + 2 kapky Nickel solution) – inkubace až do detekce pozitivního signálu

Barvení a montování tkáně

- A. 3 min 70% etanol (Penta)
- B. 3 min 90% etanol (Penta)
- C. 5 – 50 sec Eosin (Penta)
- D. 3 min 96% etanol (Penta)
- E. 3 min 100% etanol (Penta)
- F. 2x 3 min Xylen (Penta)
- G. Přilepení krycího skla pomocí montovadla Neo-Mount[®] (Merck Millipore)

3.4 Detekce krevních sraženin v končetinových pupenech

Metoda histologického barvení umožňuje studium a diagnostiku živočišných tkání. Využívá odlišných chemických vlastností buněčných komponent, které zprostředkují interakci s různými barvivy podle jejich kyselosti/zásaditosti. Získáváme buď všeobecné informace o tkáni, nebo můžeme selektivním barvením vizualizovat jen konkrétní struktury.

Za účelem detekce krevních sraženin bylo použito klasické barvení Hematoxylin-Eosin. Toto barvení je základní barvení poskytující všeobecné informace o tkáni. Díky hematoxylinu jsou jádra a bazofilní struktury zabarveny modrofialově, cytoplazma a ostatní komponenty jsou eozinem zbarvena v odstínech růžové.

3.4.1 Histologické zpracování tkáně

Fixace

- A. 3 dny v roztoku Bouin-Holland (Penta)
- B. 3x po 30 min promýt 70% etanolem (Penta)
- C. přes noc 70% etanol (Penta)

Zalítí do parafinu

- A. 3x 30 min 80% etanol (Penta)
- B. 3x 20 min 96% etanol (Penta)
- C. 3x 20 min 100% etanol (Penta)
- D. 2x 1 min Toluén (Penta)
- E. 2x 30 min parafín teplota tání 54°C (Sigma-Aldrich)
- F. 2x 1hod parafín teplota tání 58°C (Sigma-Aldrich)
- G. Vzorek jsme nechali přes noc v termostatu, druhý den tkáň naorientovali a po zatuhnutí parafínu vytvořili histologický bloček.

Krájení a lepení na sklíčka

- A. Před vlastním lepením je třeba namíchat si „bílek“
 - směs bílku a glycerinu (Penta) v poměru 1:1
 - Thymol (Lachema)
 - přefiltrovat v lednici
- B. Parafínové bločky jsme krájeli na mikrotomu (Leitz Weltzar 1212 Mintor) na tloušťku 7µm.
- C. Řezy jsme lepili na podložní sklo (P-lab), na které jsme nejprve rozetřeli bílek.
- D. Pod řezy jsme nakapali injekční stříkačkou destilovanou vodu a sklo vložili na nahřátou histologickou plotýnku (Vezas DV-1n).
- E. Po napnutí jsme parafínové řezy dali přes noc inkubovat do termostatu (Biological thermostat BT 120M) při teplotě 35°C.

3.4.2 Barvení vzorků

Před barvením celé série vzorků bylo nutné vždy udělat zkušební barvení na jednom skle. Účinnost barvení závisí na mnoha faktorech, které se mohou u různých barvení a tkání vzájemně lišit – stáří barvy, druhu barvy, stáří roztoku, druhu tkáně a na její fixaci. Proto jsou časy, po které jsou sklíčka namáčena v jednotlivých chemikáliích uvedeny v rozpětí.

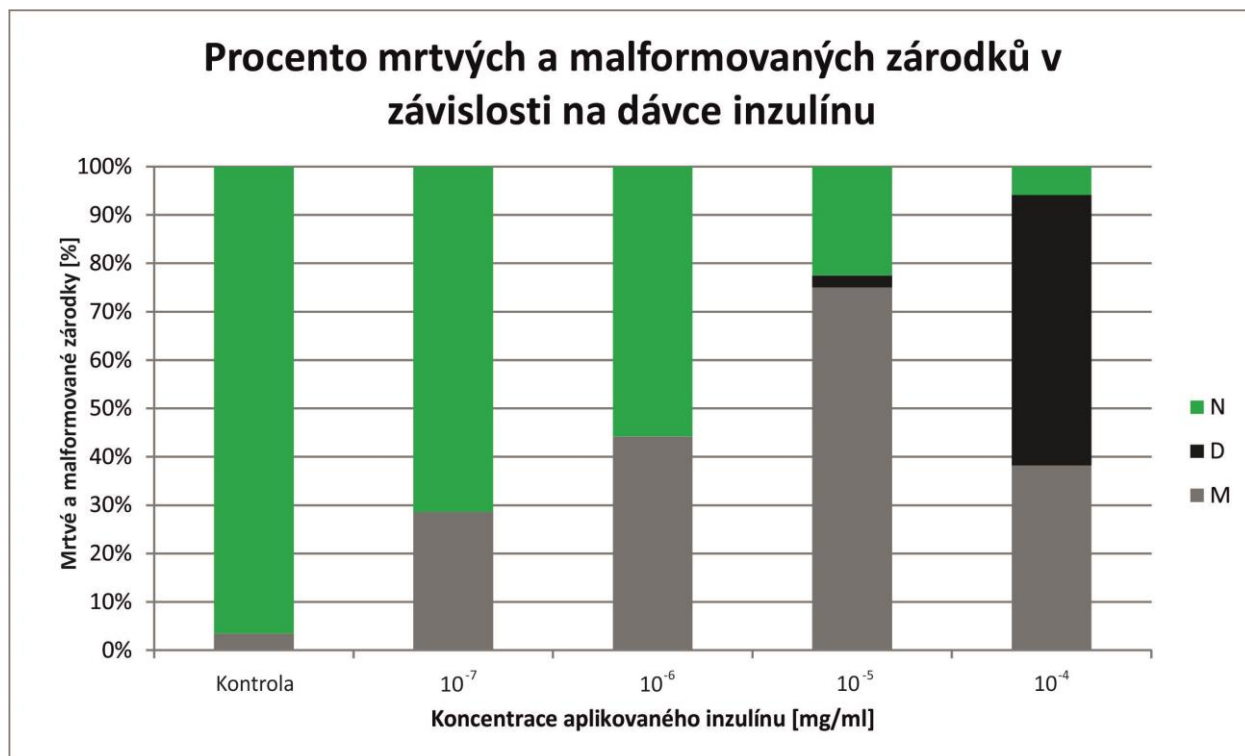
- A. 2x 6-10 min xylen (Penta)
- B. 2x 4-5 min 100% etanol (Penta)
- C. 2x 4-5 min 96% etanol (Penta)
- D. 3 min Alcianová modř (Sigma-Aldrich)
- E. 10 min tekoucí voda
- F. 5 min destilovaná voda
- G. 35 sec Hematoxylin (Sigma-Aldrich)
- H. 12 min tekoucí voda
- I. 5 min destilovaná voda
- J. 5-50 sec Eosin (Penta)
- K. 3x 0,5-1,5 min destilovaná voda
- L. 2x 4-5 min 96% etanol (Penta)
- M. 2x 4-5 min 100% etanol (Penta)
- N. 2x 6-10 min xylen (Penta)
- O. Přilepení krycího skla pomocí montovadla Neo-Mount[®] (Merck Millipore)

4 Výsledky

4.1 Inzulín dose response

Inzulín byl naředěn živným médiem do koncentrací 10^{-7} mg/ml, 10^{-6} mg/ml, 10^{-5} mg/ml a 10^{-4} mg/ml. Na ED3 a 4, tedy po 24 a 48 hodinách kultivace byla pořízena fotodokumentace a vyhodnocen jeho vliv na kuřecí zárodek. Parametry, které jsme hodnotili, byla smrt, délka kaudální části zárodku, přítomnost krevních sraženin v kaudální části embrya a dolních končetinových pupenech, správnost tvorby vitelinních cév.

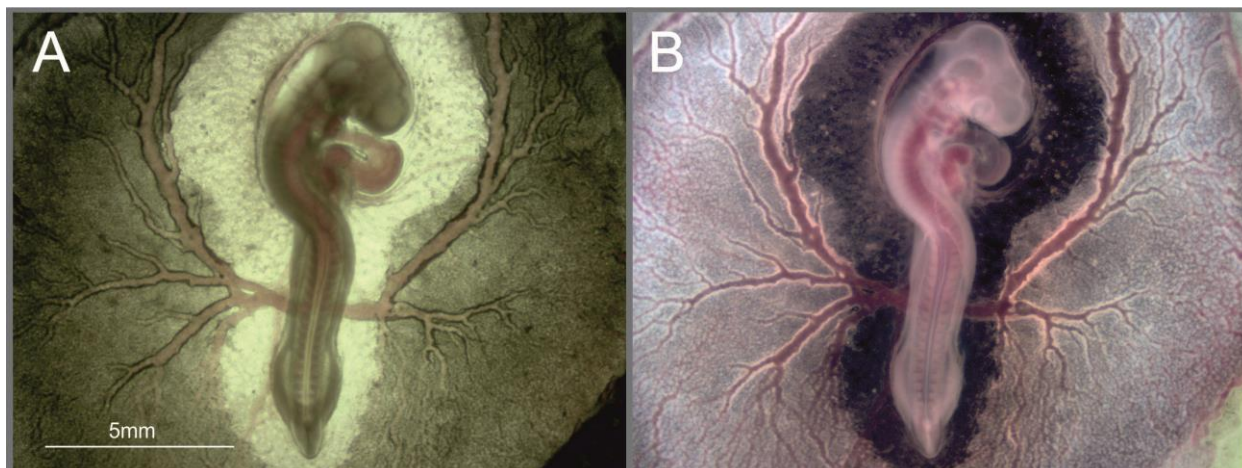
Zárodky vystavené inzulínu v koncentracích 10^{-6} až 10^{-4} mg/ml vykazovaly po 24 a 48 hodinách kultivace letalitu, malformace a růstovou retardaci. Procentuální zastoupení mrtvých a malformovaných zárodků se s rostoucí koncentrací aplikovaného inzulínu zvyšovalo (Obr. 8). V nejvyšší koncentraci 10^{-4} mg/ml bylo 56% zárodků mrtvých a 38% mělo vývojové vady. S klesající dávkou aplikovaného inzulínu kleslo i zastoupení mrtvých zárodků, naopak se zvýšilo procentuální zastoupení jedinců malformovaných. S dalším snižováním koncentrace inzulínu v živném médiu ubývalo i zárodků s vývojovými vadami.



Obrázek 8 Zastoupení mrtvých a malformovaných zárodků v jednotlivých koncentracích. Černě je vyznačeno procentuální zastoupení mrtvých (D) a šedě malformovaných zárodků (M) a zeleně je procento normálně se vyvíjejících zárodků (N).

4.2 Kontrolní skupina

Jako kontrolní skupina byly použity zárodky kultivované pouze na živném médiu bez přidaného inzulínu. Z 29 zárodků vykazovaly všechny až na jeden normální fenotyp. Normální fenotyp zárodka můžete vidět na Obr. 9.

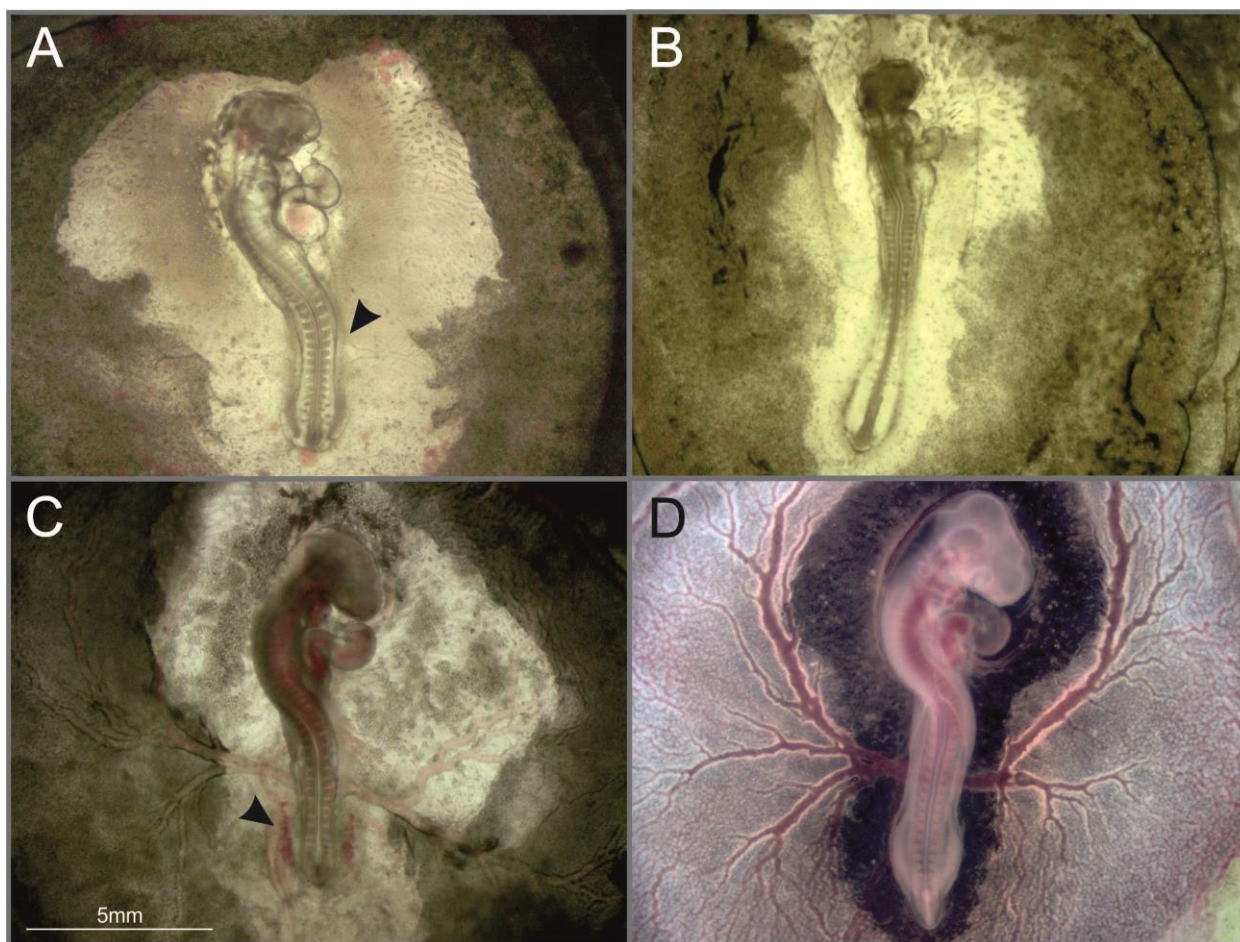


Obrázek 9 Kontrolní zárodek s normálním fenotypem. Na obrázku A je živý zárodek v ED3 z kontrolní skupiny se spodním podsvícením, na obrázku B je tentýž zárodek s nasvícením ze shora. Měřítka je 5 mm.

4.3 Efekt jednotlivých koncentrací inzulínu

4.3.1 Inzulín v koncentraci 10^{-4} mg/ml

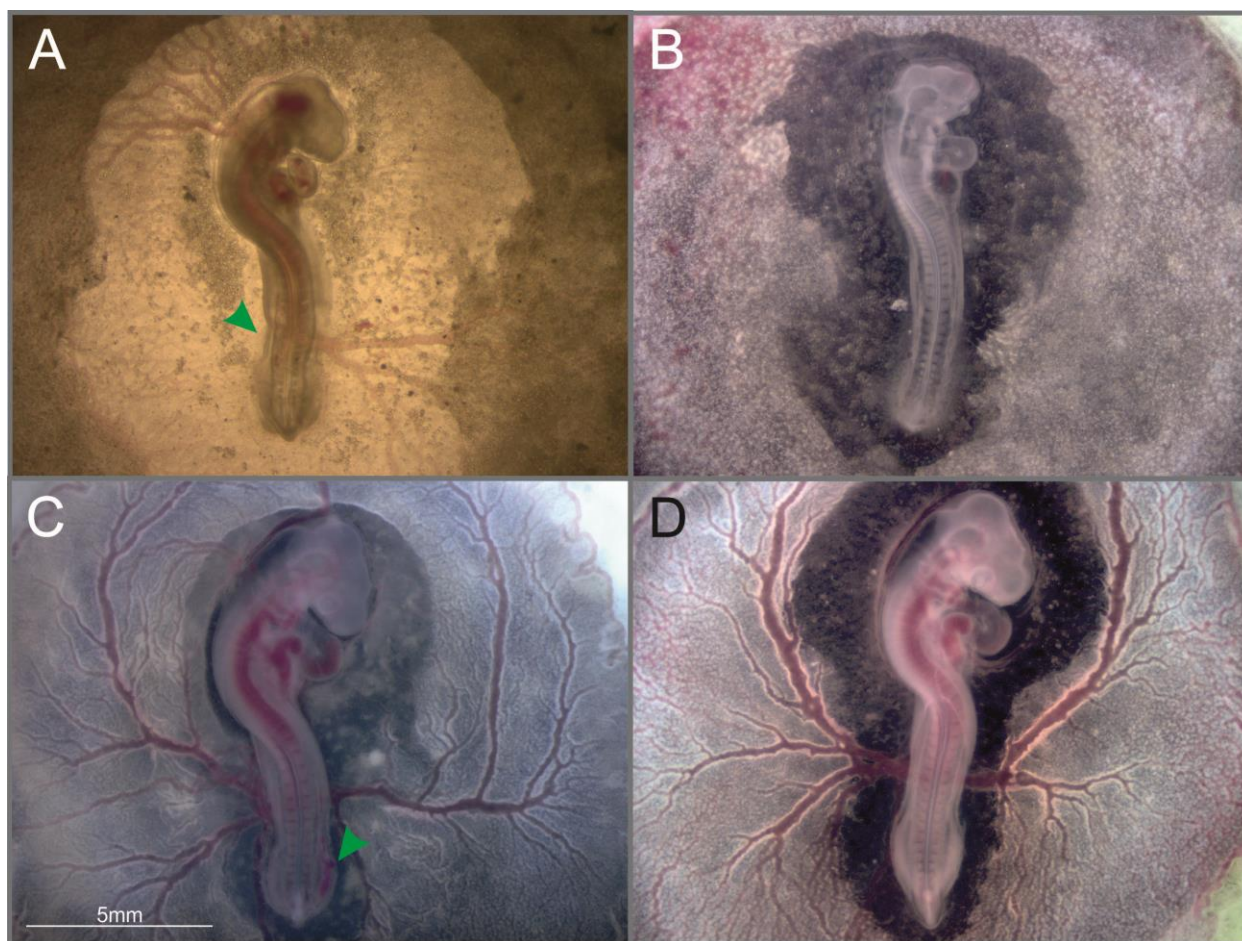
Inzulín v koncentraci 10^{-4} mg/ml způsobil do 48 hodin po expozici inzulínu u 56% zárodků smrt u dalších 38% způsobil vývojové vady. U zárodků jsme pozorovali vysokou incidenci defektů tvorby vitelinních cév (Obr. 10A), dále pak nahromadění krve v oblasti dolních končetinových pupenů (KP) (Obr. 10C) a celkovou růstovou retardaci (Obr. 10B). Vzhled zárodků vystavených této koncentraci inzulínu v porovnání s kontrolním zárodkem je vidět na Obr. 10. Porovnání vitality exponovaného a kontrolního zárodka viz příloha (8.2).



Obrázek 10 Fenotyp zárodků v ED3 vystavených působení inzulínu v koncentraci 10^{-4} mg/ml. Na obrázku A je zárodek s defektem ve vývoji vitelinních cév (odstupující céva označena šipkou). Na obrázku B je zobrazen zárodek s celkovou růstovou retardací a na obrázku C jsou u zárodku šipkou zobrazeny krevní sraženiny v oblasti dolních končetinových pupenů. Na obrázku D je pro srovnání kontrolní zárodek. Měřítka je 5 mm.

4.3.2 Inzulín v koncentraci 10^{-5} mg/ml

Inzulín v koncentraci 10^{-5} mg/ml způsobil do 48 hodin po expozici inzulínu smrt pouze u jednoho zárodku, ale 75% z nich bylo malformovaných. Mezi defekty byla opět vysoká incidence abnormální tvorby vitelinních cév (Obr. 11A). Stejně jako u předchozí koncentrace jsme u zárodků pozorovali celkovou růstovou retardaci (Obr. 11B) a nahromadění krve v oblasti dolních KP (Obr. 11C). Celkový vzhled zárodků, příklady defektů a porovnání s kontrolním zárodkem je na Obr. 11.



Obrázek 11 Fenotyp zárodků v ED3 vystavených působení inzulínu v koncentraci 10^{-5} mg/ml. Na obrázku A je zárodek s jednostranným defektem ve vývoji vitelinních cév (místo, kde by měla odstupovat druhá céva označeno šipkou). Na obrázku B můžete vidět zárodek postižený celkovou růstovou retardací a na obrázku C zárodek s nahloučenou krví v oblasti dolního KP (označeno šipkou). Na obrázku D je pro porovnání kontrolní zárodek. Měřítka je 5 mm.

4.3.3 Inzulín v koncentraci 10^{-6} mg/ml

Inzulín v koncentraci 10^{-6} mg/ml nebyl do 48 hodin po vystavení vlivu inzulínu letální pro žádný zárodek. Soubor zárodků však stále vykazoval vysoké procento malformovaných jedinců (44%). Zárodky byly postiženy zejména defekty v napojení vitelinních cév (Obr. 12A) a hromaděním krve v oblasti dolních KP (Obr. 12B). Srovnání vzhledu zárodků exponovaných inzulínu s kontrolními je na Obr. 12.



Obrázek 12 Fenotyp zárodků v ED3 vystavených působení inzulínu v koncentraci 10^{-6} mg/ml. Na obrázku A je zárodek s defekty ve vývoji vitelinních cév (odstupující cévy označeny šipkami). Na obrázku B je zárodek s nahromaděnou krví v oblasti dolních KP a na obrázku C pro porovnání zárodek z kontrolní skupiny. Měřítka jsou 5 mm respektive 3 mm.

4.3.4 Inzulín v koncentraci 10^{-7} mg/ml

Inzulín v koncentraci 10^{-7} mg/ml způsobil do 48 hodin po expozici inzulínu VV 28% zárodků. Malformované zárodky vykazovaly pouze defekty v tvorbě vitelinních cév. Vzhled kontrolního zárodka a zárodka vystaveného působení inzulínu v koncentraci 10^{-7} g/ml je vidět na Obr. 13.



Obrázek 13 Fenotyp zárodku v ED3 vystaveného působení inzulínu v koncentraci 10^{-7} mg/ml. Na obrázku A je zárodek s jednostranným defektem vývoje vitelinních cév (místo, kde by měla odstupovat chybějící céva označeno šipkou), na obrázku B je pro srovnání zárodek z kontrolní skupiny. Měřítka je 5 mm.

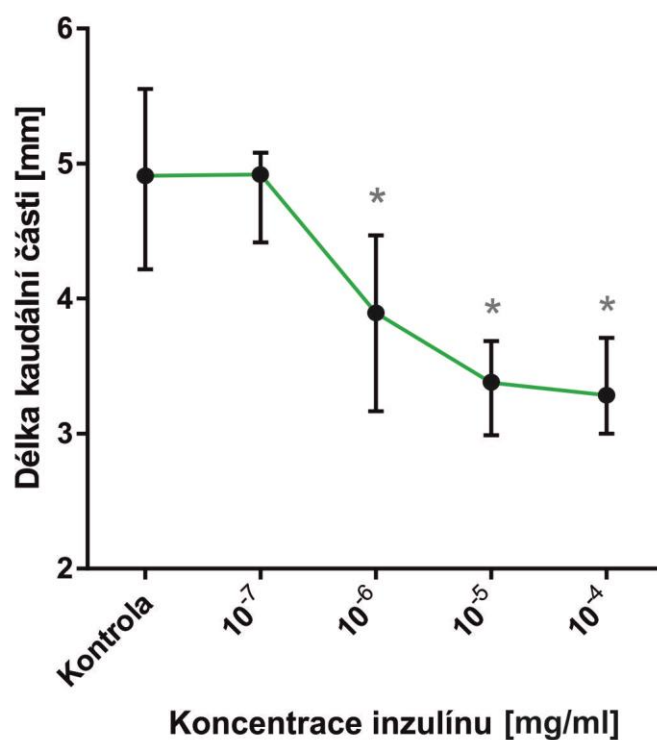
4.4 Embryotoxický efekt inzulínu

4.4.1 Vliv na vývoj kaudální části

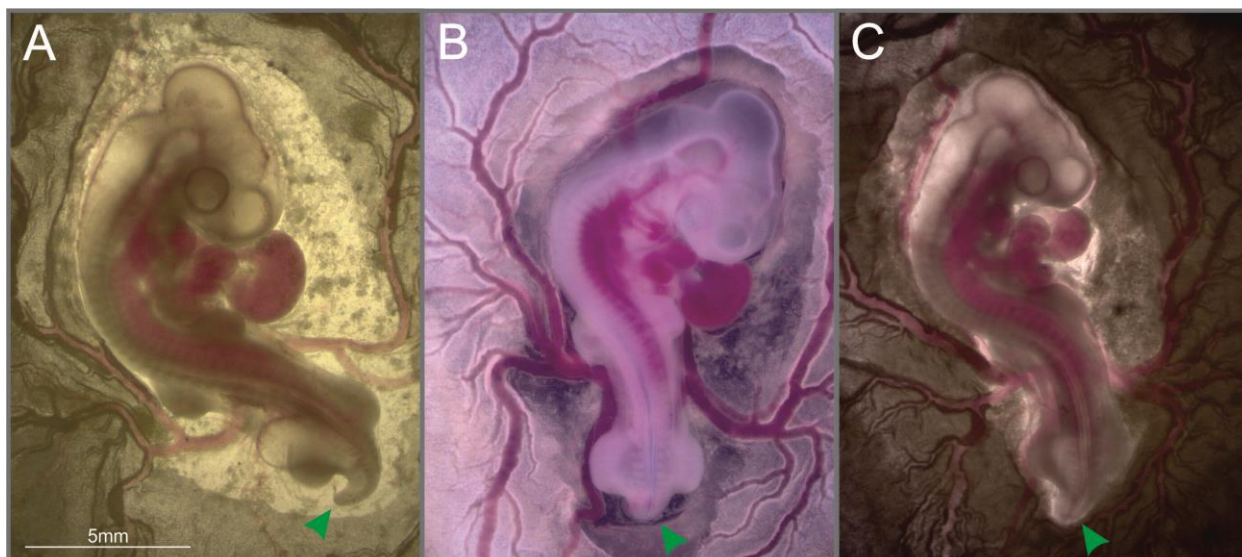
Po změření délky kaudální části vyvíjejícího se zárodku (viz Obr. 7, kapitola 3.1.5 Sledování a vyhodnocení pokusu) bylo v ED3 u zárodků vystavených inzulínu v koncentracích, 10^{-6} , 10^{-5} a 10^{-4} mg/ml pozorováno její zkrácení. U koncentrace 10^{-7} mg/ml jsme tento jev nepozorovali (Obr. 14). Po hodnocení Mann-Whitney testem se jako signifikantně významné ($P < 0,05$) ukázaly rozdíly v délce kaudální části u zárodků vystavených koncentracím 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-4} mg/ml.

Měření kaudálních částí zárodků v ED4 nebylo možné provést z důvodu zkreslení výsledných hodnot. Toto zkreslení bylo pravděpodobně způsobeno vývojem celého zárodka, kdy se narůstající části nerovnoměrně propadaly do semisolidního média a kaudální část se zanořovala pod zárodek (Obr. 15).

Závislost délky kaudální části zárodku na dávce aplikovaného inzulínu

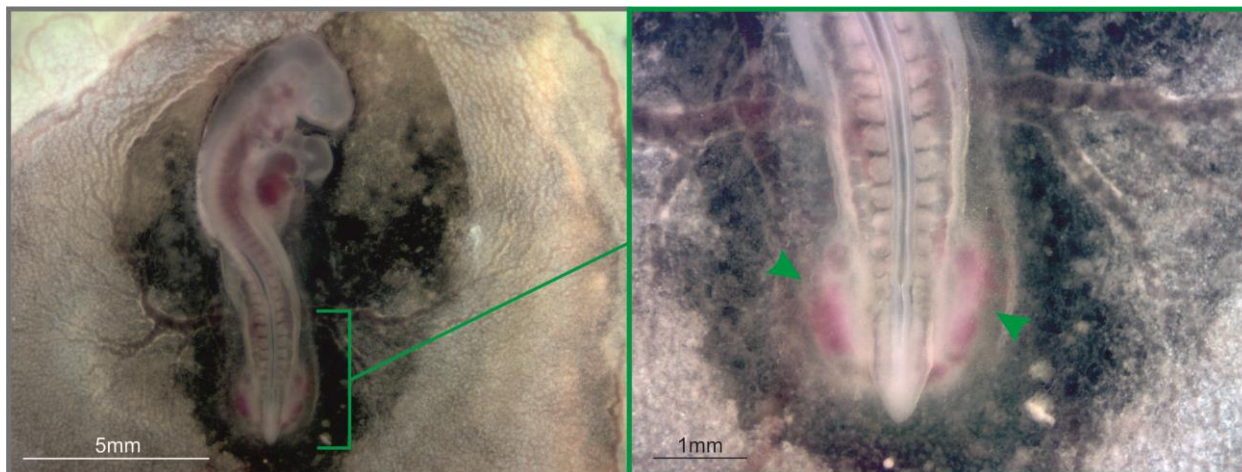


Obrázek 14 Závislost délky kaudální části na dávce aplikovaného inzulínu. Vyšší koncentrace inzulínu (10^{-6} , 10^{-5} a 10^{-4} mg/ml) signifikantně ovlivňují délku kaudální části kuřecích zárodků na ED3 ($P < 0,05$). Hvězdičkami jsou označeny signifikantně významné rozdíly, body znázorňují medián a vousy interkvartilové rozpětí.

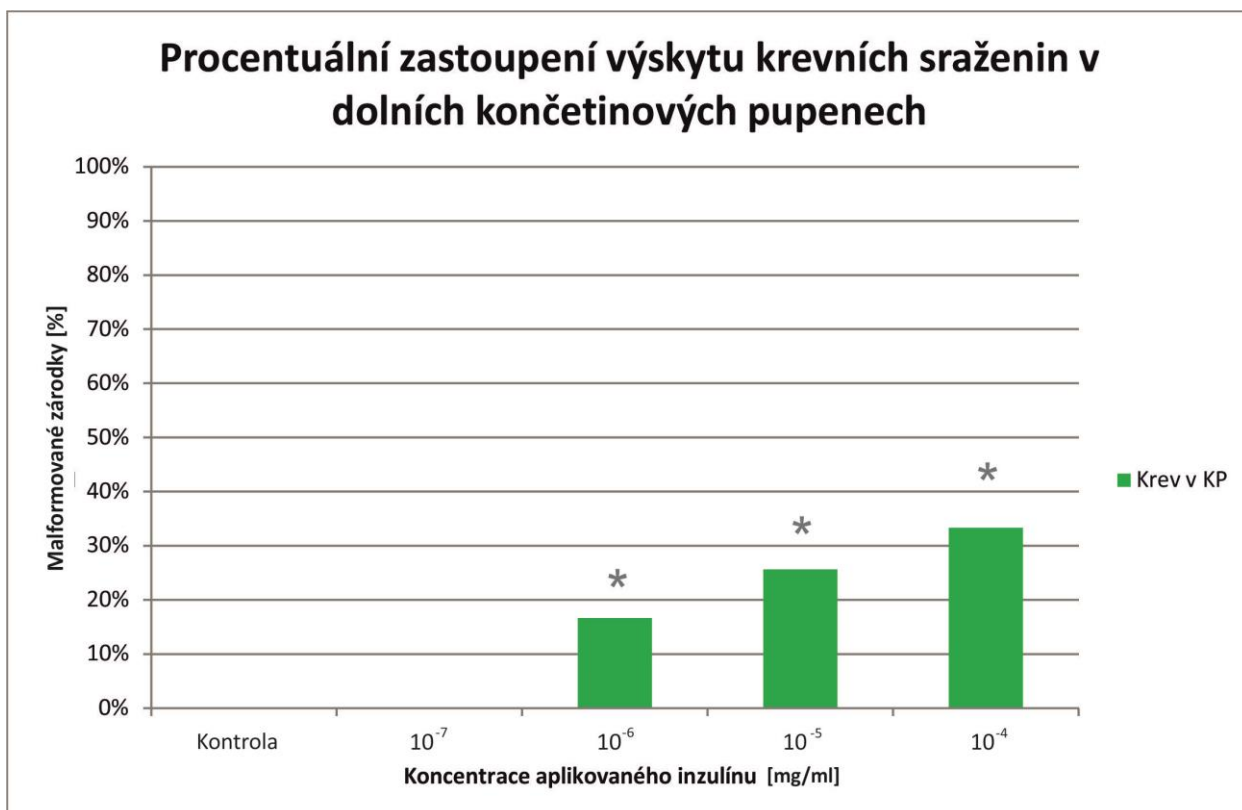


Obrázek 15 Stáječící se kaudální část zárodků v ED4. Na obrázcích A, B a C jsou zelenou šipkou označeny kaudální části kuřecích zárodků stáječící se do média. Na obrázcích B a C můžeme vidět, že špička kaudální části je stočena pod zárodek a není tak možné změřit přesnou délku celé této části. Měřítko je 5 mm.

Dalším překvapivým jevem byl u žijících zárodků výskyt krevních sraženin v dolních končetinových pupenech (KP) (Obr. 16). Největší procento žijících zárodků (33%) bylo postiženo tímto defektem při vystavení inzulínu v koncentraci 10^{-4} mg/ml, statisticky významný rozdíl ($P<0,05$) jsme pozorovali u koncentrací 10^{-6} , 10^{-5} a 10^{-4} mg/ml. Tento efekt se postupně vytrácel a v koncentraci 10^{-7} mg/ml jsme jej již nepozorovali (Obr. 17).

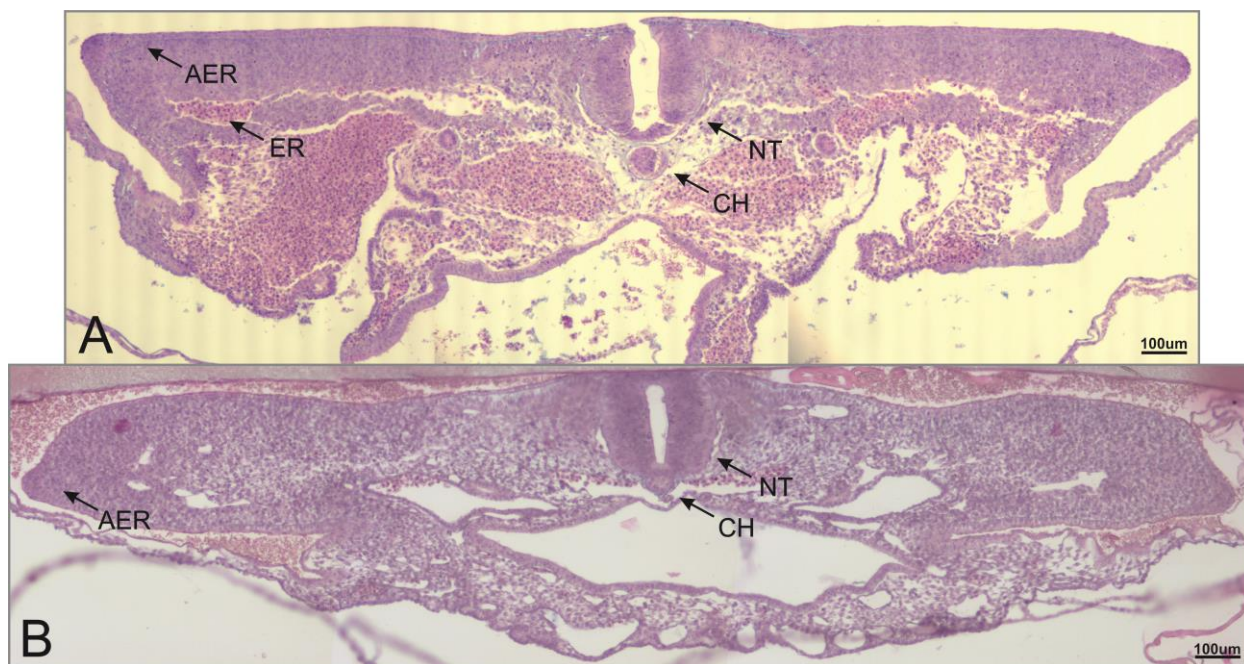


Obrázek 16 Zárodek v ED3 s krevními sraženinami v dolních končetinových pupenech. Zárodek na obrázku vpravo byl vystaven inzulínu v koncentraci 10^{-5} mg/ml. V zeleném rámečku je detail kaudální části, zelenými šipkami jsou vyznačeny krevní sraženiny v končetinovém pupenu. Měřítka je 5 mm respektive 1 mm.

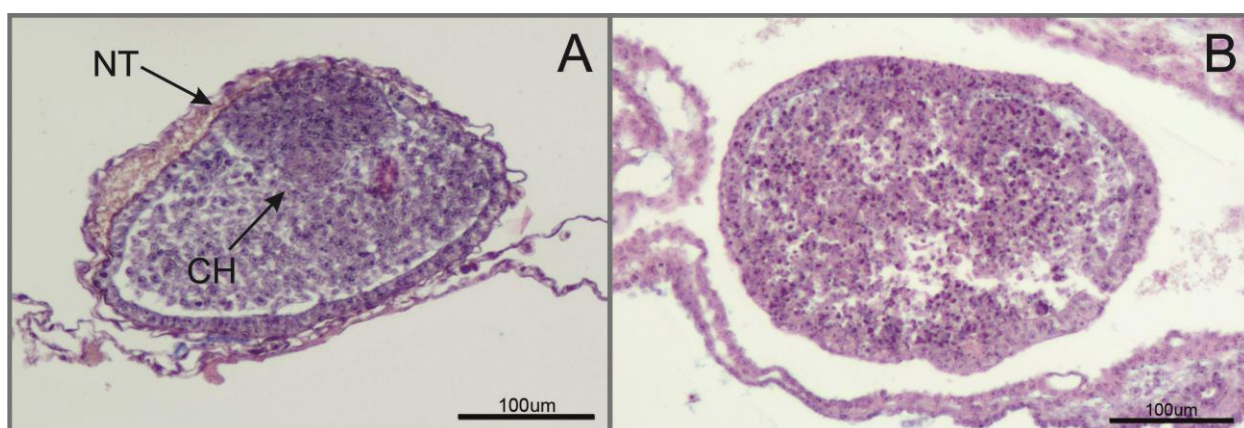


Obrázek 17 Výskyt krevních sraženin v dolních končetinových pupenech (KP). Procentuální zastoupení tohoto defektu signifikantně ($P<0,05$) stoupalo se zvyšující se dávkou inzulínu od koncentrace 10^{-6} až do 10^{-4} mg/ml. Hvězdičkami jsou označeny signifikantně významné rozdíly.

Histologické potvrzení přítomnosti erytrocytů v dolních KP na transverzálních řezech zárodkem dokládá Obr. 18. Během analýzy histologických řezů jsme si také povšimli defektů v tvorbě neurální trubice v nejkaudálnější části zárodku, kdy u některých zárodků docházelo dokonce k její absenci (Obr. 19).

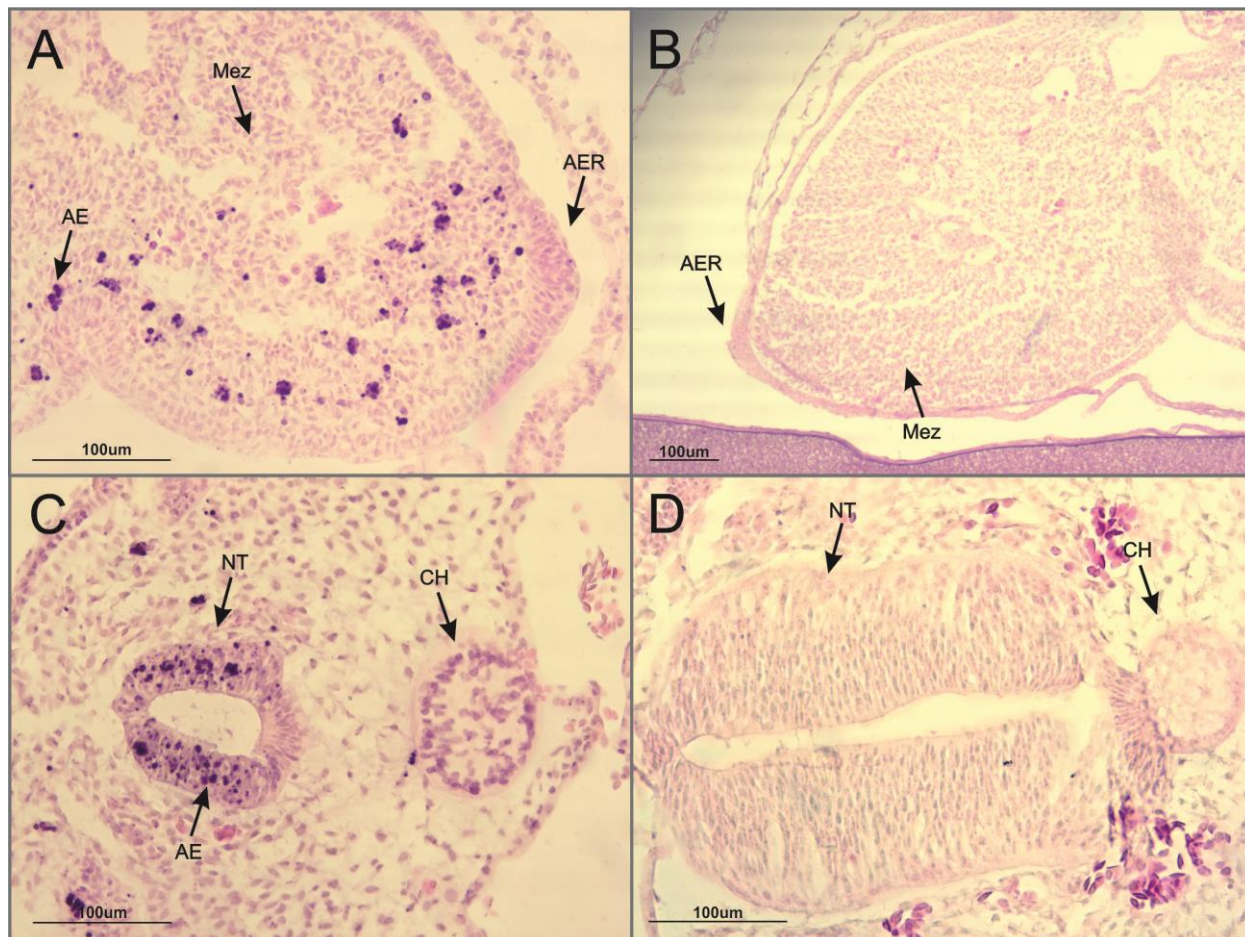


Obrázek 18 Transverzální řezy kuřecím zárodkem. Na obrázku A je zárodek v ED4 vystaven inzulinu v koncentraci 10^{-6} mg/ml s nahromaděnými erytrocyty v končetinovém pupenu. Na obrázku B je stejně starý kontrolní zárodek bez známky hromadění erytrocytů. AER – Apical ectodermal ridge, ER – Erythrocyty, CH – Chorda, NT – neurální trubice. Měřítka je 100 µm.



Obrázek 19 Transverzální řezy kuřecím zárodkem II Na obrázku A je kontrolní zárodek v ED4, na obrázku B je stejně starý zárodek vystaven inzulinu v koncentraci 10^{-6} mg/ml u kterého neurální trubice i chorda zcela chybí. NT – Neurální trubice, CH – Chorda. Měřítka je 100 µm.

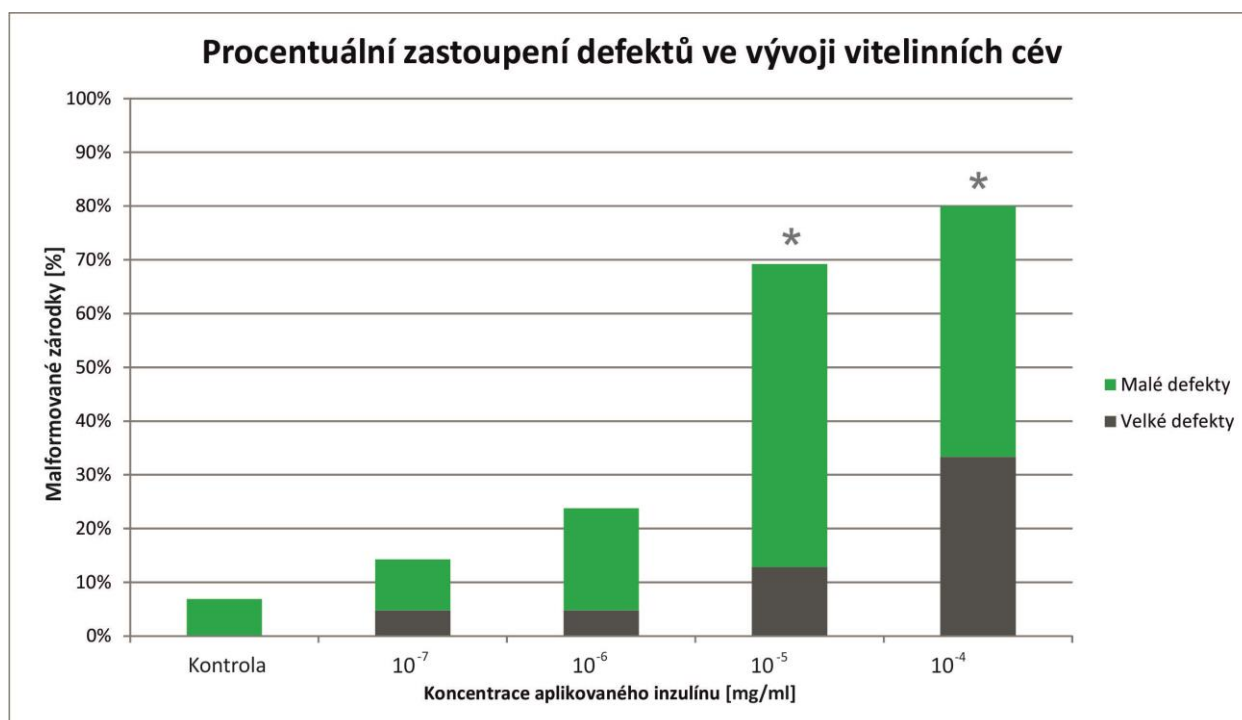
Diagnostikou apoptózy pomocí metody TUNEL jsme zjistili, že zárodky exponované inzulinu mají v končetinových pupenech (Obr. 20A) a neurální trubici (Obr. 20C) apoptotické elementy, které jsme u kontrolních zárodků nepozorovali (Obr. 20B,D)



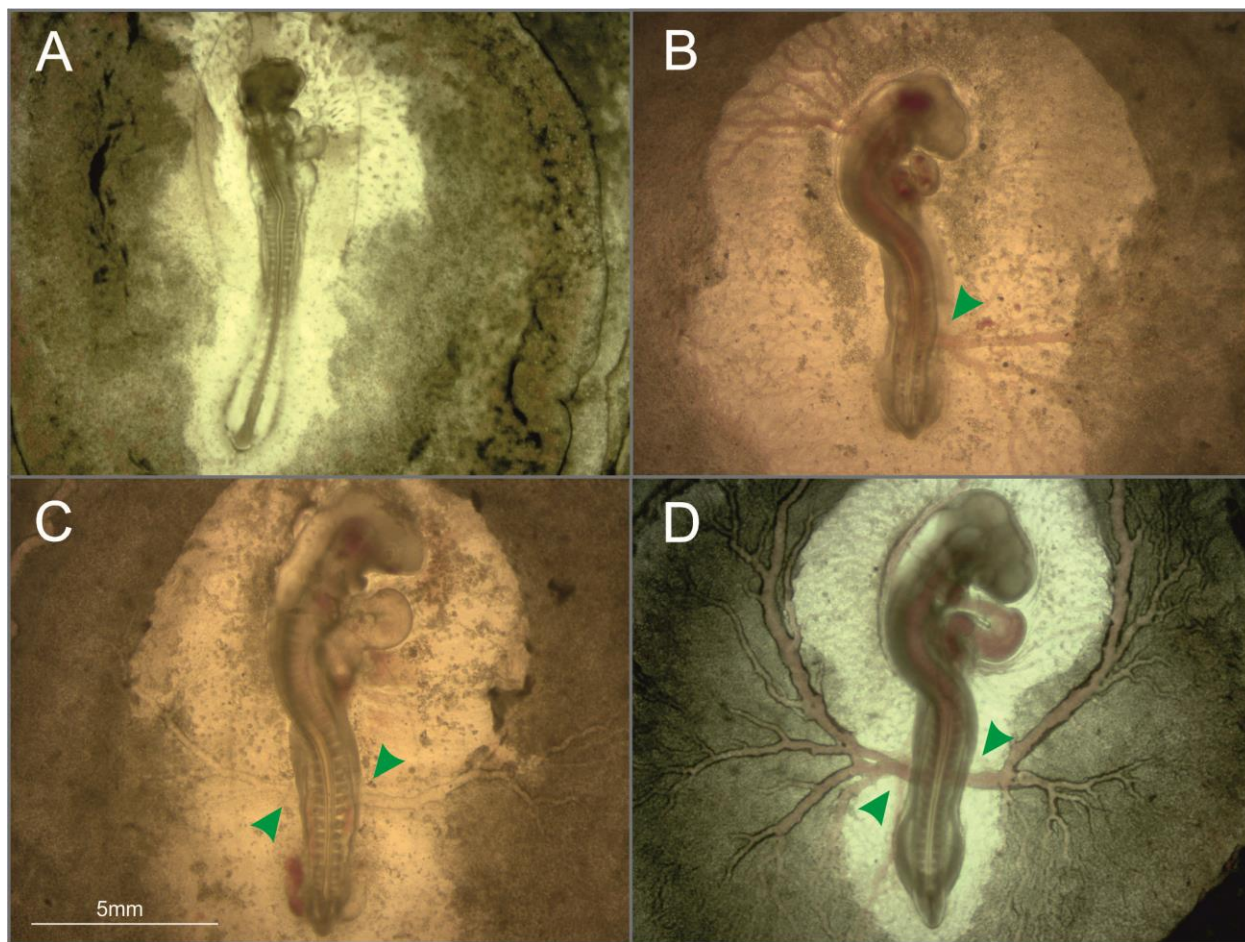
Obrázek 20 Detail transverzálních řezů končetinovými pupeny. Na obrázcích A a C je zárodek v ED4 vystavený vlivu inzulinu v koncentraci 10^{-6} mg/ml. Fialové tečky jsou nabarvené apoptotické elementy v končetinových pupenech (A) a neurální trubici (C). Na obrázcích B a D je stejně starý kontrolní zárodek bez známek apoptózy. AE – Apoptotické elementy, AER – Apical ectodermal ridge, CH – chorda, Mez – Mezenchym, NT – Neurální trubice. Měřítka je 100 μ m.

4.4.2 Vliv na napojení vitelinních cév

Defekty v napojení vitelinních cév na *area vasculosa* jsme hodnotili pouze u žijících zárodků. Velké defekty (jednostranné či oboustranné nevytvoření cév) jsme pozorovali pouze u zárodků vystavených vlivu inzulínu, malé (zjednodušené větvení cév) i u kontrolních zárodků. Procentuální zastoupení defektů obojího typu ale stoupalo úměrně s koncentrací aplikovaného inzulínu a statisticky významné bylo u koncentrací 10^{-5} a 10^{-4} mg/ml (Obr. 21). Obrazová dokumentace hodnocení defektů ve vývoji vitelinních cév je doložena na Obr. 22.



Obrázek 21 Defekty ve vývoji vitelinních cév. Se zvyšující se koncentrací podaného inzulínu se zvyšuje výskyt abnormálního napojení cév nebo dokonce jejich absence. U nejvyšších koncentrací (10^{-5} a 10^{-4} mg/ml) je toto navýšení signifikantně významné ($P < 0,05$). Zeleně je znázorněno procentuální zastoupení malých defektů, šedou velké defekty a jednostranné či oboustranné nevytvoření vitelinních cév. Hvězdičkami jsou označené signifikantně významné rozdíly.



Obrázek 22 Hodnocení defektů vývoje vitelinních cév. Na obrázcích jsou zárodky v ED3, zelenými šipkami jsou znázorněny odstupující vitelinní cévy. U zárodků, se objevovaly jak velké defekty (A) s oboustrannou respektive (B) jednostrannou absencí cévy. Pozorovali jsme i zárodky nedokonale vyvinutými cévami a jejich zjednodušeným větvením (C). U kontrolních zárodků (D) byly cévy většinou plně vyvinuty. Měřítka je 5 mm.

5 Diskuze

Testováním humánního inzulínu Insuman[®] Basal (Sanofi aventis) metodou SANDWICH na kuřecím zárodku jsme odhalili jeho embryotoxický efekt. Při podání koncentrací 10^{-6} až 10^{-4} mg/ml se projevoval letalitou, malformacemi zárodků a růstovou retardací. Procentuální zastoupení mrtvých a malformovaných zárodků se zvyšovalo s rostoucí koncentrací aplikovaného inzulínu. Inzulín v koncentraci 10^{-4} mg/ml byl pro více než 50% zárodků letální a dalších skoro 40% mělo vývojové vady. S klesající dávkou aplikovaného inzulínu klesalo i zastoupení mrtvých zárodků, naopak stoupalo procentuální zastoupení jedinců malformovaných. S dalším snižováním koncentrace inzulínu v živném médiu posléze ubývalo i zárodků s vývojovými vadami.

Tento vliv inzulínu na kuřecí zárodky odhalili také Jelínek *et al.* (1985), kteří po aplikaci humánního inzulínu ARMOUR (USA) a VUFB (ČSR) pozorovali 22% respektive 42% úmrtnost jedinců. Testováním metodou CHEST, která byla během tohoto výzkumu využita, dále odhalili, při aplikaci dávek inzulínu v koncentracích rovných než 10^{-5} mg/ml a vyšších, specificky vyvolané defekty ve vývoji kaudální části, srdce, mozku a očí, obličej, a končetin. Vysokou mortalitu jedinců (přes 40%) u stejného modelového organismu pozorovali také Julian a Abbott (1998). Březím samicím byly injikovány 2 jednotky vepřového nebo hovězího inzulínu. Po otestování těchto inzulínů konstatovali, že vepřový má ve srovnání s hovězím vyšší teratogenní účinek a tento rozdíl shledali signifikantním. Stejně i Duraiswami (1950) po aplikaci 0,05 – 6 jednotek zvířecího inzulínu do žloutkového vaku pozoroval defekty jako spina bifida, poškození obratlů, defekty ve vývoji zobáku a drápů, dále inzulín vyvolal nestandardní osifikaci a defekty končetin. Výskyt a míra vývojových vad se zvyšovaly s rostoucí dávkou. Signifikantně zvýšený počet jedinců s defekty neurální trubice pozorovali i ve studii na heterozygotních myších s genetickými mutacemi v genech *Cd* (*Crocked*) a *Rf* (*Rib fusion*), které u homozygotů způsobují vznik exencefalie, ale u heterozygotů nikoli. Vepřový inzulín byl březím samicím injikován v koncentraci 10 jednotek/kg intraperitoneálně v ED0 a ED7/18, ED8/6, ED8/12, ED8/18 nebo ED9/6. Způsoboval redukci proliferace v neuroektodermu, zpoždění a defekty v uzavírání neurální trubice a exencefalii (Cole a Trasler, 1980).

Embryotoxicitu inzulínu při testování na březích potkanech nepotvrdili Hannah a Moore (1971). Srovnávali vliv inzulínu na zárodky hladovějících samic a kontrolních skupin, kterým podávali podkožně 0,2 respektive 0,4 jednotek inzulínu v 9 a 10ED. U potomků matek

vystaveným vlivu inzulínu i hladovění pozorovali oproti kontrolám vystaveným pouze hladovění signifikantně zvýšenou frekvenci výskytu nadpočetných žeber a duplikací obratlů. V případě expozice samotnému inzulínu nedocházelo ke vzniku malformací a mláďata byla zdravá.

Jiné studie přinášejí naopak pozitivní výsledky o vlivu inzulínu na embryonální morfogenezi. Například při výzkumu na kuřecích zárodcích s mutací pro amelii, kterým byly ve stadiu 21/22 podle Hamburgera a Hamiltona (1951) (HH) odejmuty proximální i distální končetinové pupeny a dále kultivovány na médiu obsahující humánní inzulín a kontrolním médiu bez něj. V těchto kulturách docházelo k pozitivní stimulaci růstu končetinových pupenů. Při přenesení dvoudenních explantátů na médium s obsahem 10^{-9} M inzulínu byly po šesti dnech končetinové pupeny exponované inzulínu 3 – 5krát větší, ve srovnání s kontrolními, pokud médium obsahovalo 10^{-6} M inzulín došlo po šesti dnech dokonce k 4 – 7krát většímu růstu (Dealy a Kosher, 1996b). Stejný efekt byl pozorován při pěstování explantátů končetinových pupenů, ze kterých byl chirurgicky odstraněn distální mezoderm s AER, která je řídicím centrem vývoje končetiny. V porovnání s kontrolními kulturami, kultury na médiu s 10^{-9} a 10^{-6} M humánním inzulínem dosáhly výrazně větších rozměrů, v případě distálního mezodermu s „*apical ectodermal ridge*“ (AER) při expozici těmito dávkami inzulínu dochází k výraznější proliferaci, ale udržení nediferencovaného stavu (Dealy a Kosher, 1995). Dalším pokusem těchto autorů bylo vyjmutí tkání zárodku ve stadiu 10 a 11 HH z oblastí dávajícím vzniknout anteriorním a posteriorním končetinovým pupenům a regionu mezi nimi. Všechny tyto tkáně po vystavení humánnímu inzulínu ve stejných koncentracích dávaly na rozdíl od kontrol vzniknout strukturám připomínající končetinový pupen včetně AER a exprimovaly gen *Msx-2*, který je v tomto stadiu vývoje *in ovo* standardně exprimován. Nedocházelo však k expresi *Shh* genu (Dealy a Kosher, 1996a), který je nutný pro ustanovení proximo-distální polarity končetiny (Riddle *et al.*, 1993). V této studii jsme došli k jiným výsledkům. Inzulínu exponované zárodky vykazovaly defekty ve vývoji distálních končetinových pupenů. Hromadila se v nich krev a pozorovali jsme apoptotické elementy, které u kontrolních zárodků přítomny nebyly.

Pozitivní ovlivnění inzulínem potvrzují i výsledky studie Patwardhan *et al.* (2004), kteří inkubovali zárodky metodou podle New (1955). Ke zhotovení *in vitro* kultury docházelo ve stadiu 4 HH a zárodky byly exponovány hovězímu inzulínu. Pozorovali stimulaci růstu kuřecích zárodků po aplikaci 10^{-1} – 10^3 nM inzulínu. V nejvyšších koncentracích, však tento pozitivní efekt převážilo vysoké procento malformovaných jedinců, ti vykazovali defekty v somitogenezi, uzavírání neurální trubice a kompartmentaci mozku (Patwardhan *et al.*, 2004).

5.1 Kaudální část zárodku

U zárodků, kterým jsme aplikovali inzulin v koncentraci 10^{-4} g/ml došlo ke zkrácení kaudální části skoro o třetinu v porovnání s kontrolními zárodky. Dále jsme pozorovali defekty ve vývoji neurální trubice a apoptotické elementy v neurální trubici a distálních končetinových pupenech. Tato zjištění by odpovídala nálezům i v dalších studiích. Duraiswami (1950) po aplikaci zvířecího inzulinu pozoroval vysokou incidenci defektů ve tvorbě a osifikaci dolních končetin. Stejně tak po podání zvířecího (hovězího nebo vepřového) inzulinu kuřecímu zárodku pozorovali deformity kaudální části i Julian a Abbott (1998), konkrétně částečnou či úplnou dysgenezi nebo atrofii kaudálních obratlů. V této studii pozorovali velký negativní vliv inzulinu na vývoj skeletu, jako nejčastější vyhodnotili soubor vad, který je u člověka označován jako achondroplazie. Signifikantně zvýšené procento defektů kaudy zárodků po aplikaci humánního inzulinu ve své studii objevili Jelínek *et al.* (1985),

Tato zjištění korespondují s pozorováním klinických pracovníků, kteří spojují syndrom kaudální regrese u potomků diabetických matek právě s tímto onemocněním. Na pediatrické a porodnické klinice univerzity v Coloradu, USA zachytili případy dětí narozených s abnormalitami páteře, pánve a obou dolních končetin, které byly dislokované. Pozorovali i zkrácení krční páteře, defekty ve vývoji vylučovací soustavy, nesestouplá varlata, rozštěp patra a neperforovaný anus. Matky těchto dětí v těhotenství užívaly humánní inzulin Neutral protamine hagedorn (Stewart a Stoll, 1979), který je dnes v těhotenství doporučovaný (Boinpally a Jovanovic, 2009, Hone a Jovanovic, 2010, Castorino a Jovanovic, 2011). Další zevrubně popsany případ pochází z Bostonu, USA. Zde syndrom kaudální regrese objevili již při sonografických vyšetřeních, dále u potomka matky s inzulin dependentním diabetem diagnostikovali sirenomelii a defekty ve vývoji neurální trubice (Stroustrup Smith *et al.*, 2004). Zvýšenou incidenci syndromu kaudální regrese a to až 26krát pozorovali i v mnohých prospektivních studiích i Martínez-Frías *et al.* (1998), Penney *et al.* (2003), Correa *et al.* (2008), Evers *et al.* (2009) a Garne *et al.* (2012).

5.2 Metoda SANDWICH

Při vývoji nových léčiv je nezbytné zjistit, zda jsou, či nejsou vhodná k podávání těhotným ženám. Proto jsou už od druhé poloviny 20. století zdokonalována pravidla pro jejich testování, která byla poprvé vydaná světovou zdravotnickou organizací (WHO, 1967). Alternativní metody jsou nezbytnou součástí tohoto procesu a experimentální teratologie jako

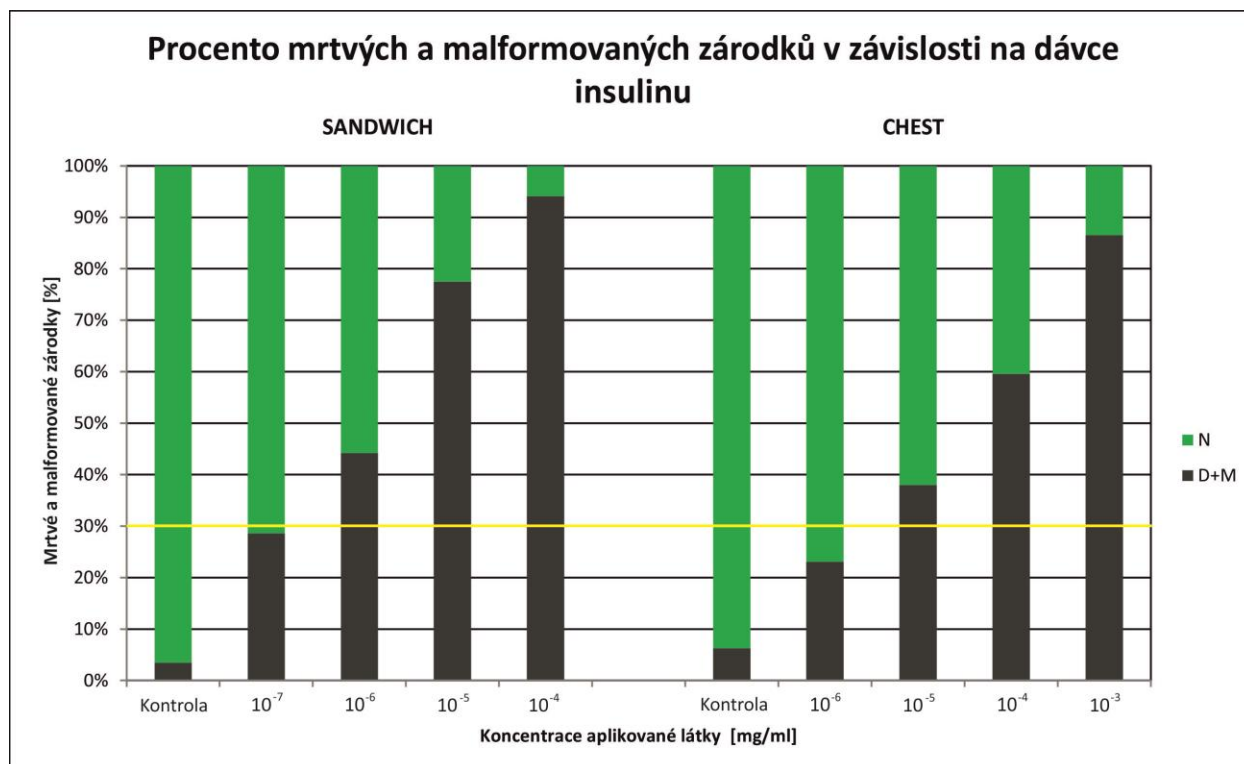
takové, a to hlavně díky výhodám, které přinášejí. Velmi přínosem je eliminace mateřského organismu při testování daného systému a tudíž minimalizace vlivu rozdílné farmakokinetiky zprostředkované mateřským organismem. Díky tomu si také můžeme být jisti, jak velké koncentraci testované látky byl zárodek vystaven. Tyto přednosti kuřecí model bezpochyby přináší. Navíc na rozdíl od testů prováděných na tkáňových a buněčných kulturách, poskytuje komplexní informace o působení zkoumaných faktorů na organismus, který se v těhotenství vyvíjí jako celek.

Asi prvním milníkem pro vyvinutí vhodné techniky pěstování kuřecího zárodku *in vitro* byla metoda publikovaná v roce 1955 (New, 1955). Kultivovaný kuřecí blastoderm byl přenesen na hodinové sklíčko, na jehož dně byl jako živná složka využit vaječný bílek. Sklíčko pak bylo v Petriho misce podloženo vatou s převařenou vodou, čímž bylo zajištěno proti zhoupnutí, zároveň tím byla zajištěna optimální vlhkost při inkubaci zárodku. Vitelinní membrána, na které zárodek roste, byla proti shrnutí zajištěna natažením na skleněný kroužek, který byl položen na hodinovém sklíčku. Při této technice se přenášely zárodky v časném embryonálním stádiu. Přežilo 93% zárodků, které se vyvíjely až do stádia 20 somitů (13 HH) a rychlost vývoje nejevila známky zpomalení v porovnání se zárodky vyvíjejícími se *in ovo* pozorovanými Hamburgerem a Hamiltonem (1951). Zárodky byly schopné vytvořit krevní oběh a došlo k jejich flexi a torzi. Právě přenášení časných stadií je výhodou této metody, stejně tak jako využití vaječného bílku jako média pro kultivaci. To z ní činí metodu jednoduchou a levnou. Je ovšem náročné správně manipulovat s kulturou během napínání vitelinní membrány na skleněný kroužek, pokud dojde k nepřiměřenému natažení, může přílišné pnutí ovlivňovat vývoj zárodku, nebo dokonce dojít k ruptuře. To se dá hodnotit jako největší nedostatek této metody.

Modifikací této metody bylo pěstování časných stadií kuřecího zárodku (1 – 10ED) v Petriho misce na agarovém médiu obsahujícím bílek z neoplozených vajec a antibiotika (Chapman *et al.*, 2001). K přenesení do *in vitro* systému docházelo za pomoci filtračního papíru, ve kterém jsou 4 se překrývající kruhové otvory a který byl okolo blastodermu umístěn, tak, aby byl zárodek co nejvíce ve středu a následně byl obstřižen. Ke správnému vývoji, který není odlišný od vývoje *in ovo* dochází až u 80% zárodků, ty mohou být rutinně pěstovány až do stadií 15-17 HH. Autoři jako výhody oproti metodě New (1955) uvádějí využití obyčejného filtračního papíru místo skleněných kroužků, což zvyšuje nenáročnost této metody. Dalším benefitem je přirozené napětí vitelinní membrány, kterého je dosaženo umístěním kroužku přímo na žloutkový vak, před vystřižením blastodermu. Dalšími nepochybnými výhodami jsou rychlost a jednoduchá manipulace, jak při zhotovování kultury tak při manipulaci s ní.

Stejně jako Chapmanova Early chick (EC) metoda (2001) využívá metoda SANDWICH filtračního papíru, ten je zde ale vystřižen do tvaru kruhu. K umístování kroužku dochází obdobně – zárodek je situován co nejvíce do středu. To tedy analogicky zajistí přirozené napětí vitelinní membrány, na rozdíl od EC metody ale u SANDWICH metody podkládáme membránu druhým kroužkem ještě zespodu, abychom zabránili shrnutí a zeslabení její přirozené tenze, což může přirozený vývoj také ovlivnit. Stejně jako EC metoda je metoda SANDWICH nenáročná, jednoduchá a rychlá. Lze ji provádět rutinně. Testujeme při ní ovšem starší zárodky (stádia 11-13 HH). Další rozdíl je také ve složení média, které plně syntetické. Jeho výhodou je konstantní složení bohaté na aminokyseliny, které jsou důležité pro růst zárodku. Zárodky bez degenerativních změn pěstujeme až do ED4.

Chronická expozice testované látky, kterou metoda SANDWICH umožňuje, je jedna z možností jak zvýšit senzitivitu testů teratogenicity, zejména u látek, které jsou v těhotenství užívány dlouhodobě. Toto tvrzení podporuje porovnání výsledků této diplomové práce s dalšími výsledky získanými v naší laboratoři. Při testování humánního inzulínu Insuman[®] Bazal byl odhadovaný začátek pásma embryotoxicity umístěn mezi koncentrace 10^{-6} a 10^{-5} mg/ml (Turková, 2011), ke stejným výsledkům dospěli i Jelínek *et al.* (1985) u humánních inzulínů ARMOUR (USA) a VUFB (ČSR). Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity je podle Jelínka *et al.* (1985) stanoven mezi koncentracemi, kdy u jedné procento mrtvých a malformovaných zárodků přesahuje hodnotu 30% a u druhé ještě ne. Tato hranice určena pro kuřecí modelový organismus za pomoci metody CHEST představuje maximální hodnotu spontánního úhynu a vzniku malformací zárodků. Pokud tedy procentuální zastoupení mrtvých a malformovaných zárodků tuto mez překročí, můžeme tvrdit, že pozorovaný jev je vyvolán specificky aplikovanou látkou. Při srovnání našich výsledků s těmito fakty pozorujeme posunutí odhadovaného začátku pásma embryotoxicity směrem k nižším koncentracím (Obr. 23). Hranice určovaná dle tohoto klíče by se v našem případě vyskytovala mezi koncentracemi 10^{-7} a 10^{-6} mg/ml. Ve skupině zárodků vystaveným působení inzulínu v koncentraci 10^{-7} mg/ml však pozorujeme 28% mrtvých a malformovaných zárodků, což je velmi hraniční hodnota. Proto se nedá s jistotou určit, zda je tato koncentrace pro užívání v těhotenství bezpečná.



Obrázek 23 Porovnání zastoupení mrtvých a malformovaných zárodků exponovaných inzulinu metodou CHEST a SANDWICH. Žlutá čára značí horní hranici vzniku spontánních malformací (Jelinek *et al.*, 1985), šedě je vyznačeno procentuální zastoupení mrtvých a malformovaných zárodků (D+M) a zeleně normálních (N). Vpravo jsou výsledky získané metodou CHEST (Turková, 2011), vlevo naše výsledky získané metodou SANDWICH.

Tyto výsledky tedy naznačují, že metoda SANDWICH je vhodným doplněním alternativních testů při skriningu toxicity látek a má potenciál vylepšit jejich senzitivitu a tím i kvalitu těchto testů. Navíc testování na kuřecím modelu umožní odlišení efektu inzulinu od efektu narušeného metabolismu matky.

Výsledky také poukazují na embryotoxický efekt humánního inzulinu, který je dnes v léčbě těhotných diabetiček využíván (Boinpally a Jovanovic, 2009, Hone a Jovanovic, 2010, Castorino a Jovanovic, 2011). Defekty, které jsme na kuřecích zárodcích exponovaných inzulinu pozorovali, jasně poukazují na jeho negativní vliv na vývoj cévní soustavy, neurální trubice a kaudální části. Také poukazují na možné vyvolání syndromu kaudální regrese, který se u dětí diabetických matek vyskytuje častěji, než u dětí pocházejících z fyziologických těhotenství. Je proto důležité zvážit výši jeho dávek při užívání během těhotenství. Správná životospráva může být účinným nástrojem ke snížení potřebných dávek léčiva. Také včasné plánování těhotenství účinně snižuje výskyt velkých vrozených vad u dětí diabetiček vyžadujících inzulin až o 8% (Evers *et al.*, 2004).

6 Závěry

1. Při ověřování embryotoxicity inzulínu na zárodku kuřete jsme odhalili jeho negativní vliv. U zárodků exponovaných koncentracemi 10^{-6} až 10^{-4} mg/ml způsoboval letalitu, růstovou retardaci a malformace. U zárodků jsme pozorovali defekty ve tvorbě vitelinních cév a napojení na *area vasculosa*, tvorbu krevních sraženin v dolních končetinových pupenech, defekty ve vývoji neurální trubice a signifikantní zkrácení kaudální části.
2. Výskyt defektů ve vývoji neurální trubice a zkrácení kaudální části zárodku potvrdil, že vývoj kaudální části zárodku může být inzulínem ovlivněn.
 - Defekty ve vývoji dolních končetin a kaudální části připisujeme výskytu apoptózy, která u kontrolních zárodků pozorována nebyla. To a absence neurální trubice poukazuje na fakt, že inzulín může být jedním z faktorů zapříčiňujícím častý výskyt syndromu kaudální regrese u dětí diabetických matek.
 - Při zjišťování vhodného embryonálního dne pro měření délky kaudální části jsme dospěli k závěru, že jím je třetí embryonální den, tedy den po expozici inzulínem. Ve čtvrtém embryonálním dni docházelo ke zkreslení měření kvůli vývoji celého zárodku, kdy se narůstající části nerovnoměrně propadaly do semisolidního média a kaudální část se zanořovala pod zárodek.
3. Při porovnání výsledků s výsledky získanými metodou CHEST jsme zjistili, že metoda SANDWICH je o jeden až dva řády citlivější. Představuje poměrně rychlou a levnou metodou detekce embryotoxicity na časných vývojových stádiích. Je tedy vhodným doplněním alternativních testů při skríningu toxicity a má potenciál vylepšit jejich senzitivitu a tím i kvalitu.

7 Použitá literatura

- American Diabetes, A., 2011. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes care*, 34 Suppl 1, S11-61.
- American Diabetes, A., 2012. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 35, S64-S71.
- American Diabetes, A., 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37 Suppl 1, S81-90.
- American Diabetes, A., 2015. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care*, 38 Suppl, S8-S16.
- Anderson, J.L., Waller, D.K., Canfield, M.A., Shaw, G.M., Watkins, M.L. & Werler, M.M., 2005. Maternal obesity, gestational diabetes, and central nervous system birth defects. *Epidemiology*, 16, 87-92.
- Begum, S., Huda, S.N., Musarrat, N., Ahmed, S., Banu, L.A. & Ali, S.M.K., 2002. Nutritional status and birth outcomes of the diabetic and non-diabetic pregnant women. *Bangladesh Medical Research Council bulletin*, 28, 97-103.
- Berger, M., Jörgens, V. & Chlup, R., 1995. *Léčba inzulínem v každodenním životě* Praha: Victoria publishing.
- Bloomgarden, Z., Stell, L. & Jovanovic, L., 2010. Treatment for Mild Gestational Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 362, 366-366.
- Boinpally, T. & Jovanovic, L., 2009. Management of Type 2 Diabetes and Gestational Diabetes in Pregnancy. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 76, 269-280.
- Boyle, J.P., Honeycutt, A.A., Narayan, K.M.V., Hoerger, T.J., Geiss, L.S., Chen, H. & Thompson, T.J., 2001. Projection of diabetes burden through 2050 - Impact of changing demography and disease prevalence in the US. *Diabetes Care*, 24, 1936-1940.
- Brown, N.A., Spielmann, H., Bechter, R., Flint, O.P., Freeman, S.J., Jelinek, R.J., Koch, E., Nau, H., Newall, D.R., Palmer, A.K., Renault, J.Y., Repetto, M.F., Vogel, R. & Wiger, R., 1995. Screening chemicals for reproductive toxicity: The current alternatives the report and recommendations of an ECVAM/ETS workshop (ECVAM workshop 12). *Atla-Alternatives to Laboratory Animals*, 23, 868-882.
- Brown, Z.A., Mills, J.L., Metzger, B.E., Knopp, R.H., Simpson, J.L., Jovanovicpeterson, L., Scheer, K., Vanallen, M.I., Aarons, J.H. & Reed, G.F., 1992. Early sonographics evaluation for fetal growth delay and congenital-malfomations in pregnancies complicated by insulin-requiring diabetes. *Diabetes Care*, 15, 613-619.
- Brož, J., 2015. *Léčba inzulínem* Praha: Maxdorf.
- Buchanan, T.A. & Xiang, A.H., 2005. Gestational diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 485-491.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A. & Butler, P.C., 2003. beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52, 102-110.
- Calonge, N., Petitti, D.B., Dewitt, T.G., Gordis, L., Gregory, K.D., Harris, R., Isham, G., Lefevre, M.L., Loveland-Cherry, C., Marion, L.N., Moyer, V.A., Ockene, J.K., Sawaya, G.F., Siu, A.L., Teutsch, S.M., Yawn, B.P. & Force, U.S.P.S.T., 2008. Screening for gestational diabetes mellitus: US preventive services task force recommendation statement. *Annals of Internal Medicine*, 148, 759-U67.
- Castorino, K. & Jovanovic, L., 2011. Pregnancy and Diabetes Management: Advances and Controversies. *Clinical Chemistry*, 57, 221-230.

- Cedergren, M.I. & Kallen, B.A.J., 2003. Maternal obesity and infant heart defects. *Obesity Research*, 11, 1065-1071.
- Chapman, S.C., Collignon, J., Schoenwolf, G.C. & Lumsden, A., 2001. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Developmental Dynamics*, 220, 284-289.
- Clausen, T.D., Hellmuth, E., Mathiesen, E., Mandrup-Poulsen, T., Ekbom, P. & Damm, P., 2005. Poor pregnancy outcome in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28, 323-328.
- Coffinier, C., Barra, J., Babinet, C. & Yaniv, M., 1999. Expression of the vHNF1/HNF1 beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mechanisms of Development*, 89, 211-213.
- Cole, W.A. & Trasler, D.G., 1980. Gene-teratogen interaction in insulin-induced mouse exencephaly. *Teratology*, 22, 125-139.
- Combs, C.A., Gunderson, E., Kitzmiller, J.L., Gavin, L.A. & Main, E.K., 1992. Relationship of fetal macrosomia to maternal postprandial glucose control during pregnancy. *Diabetes Care*, 15, 1251-1257.
- Conway, D.L. & Langer, O., 1998. Elective delivery of infants with macrosomia in diabetic women: Reduced shoulder dystocia versus increased cesarean deliveries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 178, 922-925.
- Conway, S.J., Henderson, D.J. & Copp, A.J., 1997. Pax3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: Evidence from the splotch (Sp(2H)) mutant. *Development*, 124, 505-514.
- Correa, A., Gilboa, S.M., Besser, L.M., Botto, L.D., Moore, C.A., Hobbs, C.A., Cleves, M.A., Riehle-Colarusso, T.J., Waller, K., Reece, E.A. & Natl Birth Defects Prevention, S., 2008. Diabetes mellitus and birth defects. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199.
- Cundy, T., Gamble, G., Townend, K., Henley, P.G., Macpherson, P. & Roberts, A.B., 2000. Perinatal mortality in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 17, 33-39.
- Davis, E.M., Peck, J.D., Thompson, D., Wild, R.A. & Langlois, P., 2010. Maternal Diabetes and Renal Agenesis/Dysgenesis. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology*, 88, 722-727.
- Dealy, C.N. & Kosher, R.A., 1995. Studies on insulin-like growth-factor-I and insulin in chick limb morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 202, 67-79.
- Dealy, C.N. & Kosher, R.A., 1996a. IGF-I and insulin in the acquisition of limb-forming ability by the embryonic lateral plate. *Developmental Biology*, 177, 291-299.
- Dealy, C.N. & Kosher, R.A., 1996b. IGF-I, insulin and FGFs induce outgrowth of the limb buds of amelic mutant chick embryos. *Development*, 122, 1323-1330.
- Duraiswami, P.K., 1950. Insulin-induced skeletal abnormalities in developing chickens. *British Medical Journal*, 2, 384-390.
- Ehrenberg, H.M., Durnwald, C.P., Catalano, P. & Mercer, B.M., 2004a. The influence of obesity and diabetes on the risk of cesarean delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191, 969-974.
- Ehrenberg, H.M., Mercer, B.M. & Catalano, P.M., 2004b. The influence of obesity and diabetes on the prevalence of macrosomia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191, 964-968.
- Ekbom, P., Damm, P., Feldt-Rasmussen, B., Feldt-Rasmussen, U., Molvig, J. & Mathiesen, E.R., 2001. Pregnancy outcome in type 1 diabetic women with microalbuminuria. *Diabetes Care*, 24, 1739-1744.

- Eom, D.S., Amarnath, S., Fogel, J.L. & Agarwala, S., 2011. Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. *Development*, 138, 3179-3188.
- Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T.M. & Edlund, T., 1995. Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons - a common signal for ventral patterning within the neural-tube. *Cell*, 81, 747-756.
- Evers, I.M., De Valk, H.W. & Visser, G.H.A., 2009. Male Predominance of Congenital Malformations in Infants of Women With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 32, 1194-1195.
- Evers, I.N., De Valk, H.W. & Visser, G.H.A., 2004. Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *British Medical Journal*, 328, 915-918A.
- Fajans, S.S., Bell, G.I. & Polonsky, K.S., 2001. Mechanisms of disease: Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *New England Journal of Medicine*, 345, 971-980.
- Farrell, T., Neale, L. & Cundy, T., 2002. Congenital anomalies in the offspring of women with Type 1, Type 2 and gestational diabetes. *Diabetic Medicine*, 19, 322-326.
- Ferenc, B., Acs, N., Puho, E.H. & Czeizel, A.E., 2010. Congenital abnormalities in the offspring of pregnant women with type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus: A population-based case-control study. *Congenital Anomalies*, 50, 115-121.
- Fine, E.L., Horal, M., Chang, T.I., Fortin, G. & Loeken, M.R., 1999. Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes*, 48, 2454-2462.
- Foulis, A.K., McGill, M. & Farquharson, M.A., 1991. Insulitis in type-1 (insulin dependent) Diabetes-mellitus in man - macrophages, lymphocytes, and interferon-gama containing cells. *Journal of Pathology*, 165, 97-103.
- Frias, J.L., Frias, J.P., Frias, P.A. & Martinez-Frias, M.L., 2007. Infrequently studied congenital anomalies as clues to the diagnosis of maternal diabetes mellitus. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A, 2904-2909.
- Fu, J., Tay, S.S.W., Ling, E.A. & Dheen, S.T., 2006. High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells. *Diabetologia*, 49, 1027-1038.
- Ganong, W.F., 1995. Přehled lékařské fyziologie. Jinočany: Vydavatelství a nakladatelství H&H.
- Garne, E., Loane, M., Dolk, H., Barisic, I., Addor, M.C., Arriola, L., Bakker, M., Calzolari, E., Dias, C.M., Doray, B., Gatt, M., Melve, K.K., Nelen, V., O'mahony, M., Pierini, A., Randrianaivo-Ranjatoelina, H., Rankin, J., Rissmann, A., Tucker, D., Verellun-Dumoulin, C. & Wiesel, A., 2012. Spectrum of congenital anomalies in pregnancies with pregestational diabetes. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology*, 94, 134-140.
- Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J.R. & Gruss, P., 1991. Pax-3, a novel murine DNA-binding protein expressed during early neurogenesis. *Embo Journal*, 10, 1135-1147.
- Hamburger, V. & Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88, 49-&.
- Hannah, R.S. & Moore, K.L., 1971. Effect of fasting and insulin on skeletal development in rats. *Teratology*, 4, 135-&.
- Haumaitre, C., Fabre, M., Cormier, S., Baumann, C., Delezoide, A.L. & Cereghini, S., 2006. Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1 beta/MODY5 mutations. *Human Molecular Genetics*, 15, 2363-2375.

- Hone, J. & Jovanovic, L., 2010. Approach to the Patient with Diabetes during Pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95, 3578-3585.
- Hu, B., Nadiri, A., Bopp-Kuchler, S., Perrin-Schmitt, F. & Lesot, H., 2005. Dental epithelial histomorphogenesis in vitro. *Journal of Dental Research*, 84, 521-525.
- Int Assoc Diabet, P., 2010. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care*, 33, 676-682.
- Inzucchi, S.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A.L., Tsapas, A., Wender, R. & Matthews, D.R., 2012. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. *Diabetes Care*, 35, 1364-1379.
- Jelinek, R., Peterka, M. & Rychter, Z., 1985. Chick embryotoxicity screenig-test - 130 substances tested. *Indian Journal of Experimental Biology*, 23, 588-595.
- Jelínek R, Rychter Z, Peterka M, 1979. Method for testing embryotoxicity on chicken embryo. United States patent č. 4153676
- Jensen, D.M., Damm, P., Moelsted-Pedersen, L., Ovesen, P., Westergaard, J.G., Moeller, M. & Beck-Nielsen, H., 2004. Outcomes in type 1 diabetic pregnancies - A nationwide, population-based study. *Diabetes Care*, 27, 2819-2823.
- Jovanovic, L., 2006. The importance of postprandial glucose concentration: Lessons learned from diabetes and pregnancy. *Drug Development Research*, 67, 591-594.
- Julian, D. & Abbott, U.K., 1998. An avian model for comparative studies of insulin teratogenicity. *Anatomia Histologia Embryologia-Journal of Veterinary Medicine Series C-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe C*, 27, 313-321.
- Kaaja, R., 2011. Vascular complications in diabetic pregnancy. *Thrombosis Research*, 127, S53-S55.
- Krausova, T. & Peterka, M., 2007. Teratogenic and lethal effects of 2-24 h hyperthermia episodes on chick embryos. *Journal of Thermal Biology*, 32, 193-203.
- Kudva, Y.C. & Butler, P.C., 1997. *Insulin secretion in type II diabetes mellitus*.
- Kuhl, C., 1991. Etiology of gestational diabetes. *Baillieres Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 5, 279-292.
- Kumar, S.D., Dheen, S.T. & Tay, S.S.W., 2007. Maternal diabetes induces congenital heart defects in mice by altering the expression of genes involved in cardiovascular development. *Cardiovascular Diabetology*, 6.
- Kučera, J., 1989. Populační teratologie. Praha: Avicenum/zdravotnické nakladatelství.
- Li, R.L., Chase, M., Jung, S.K., Smith, P.J.S. & Loeken, M.R., 2005. Hypoxic stress in diabetic pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289, E591-E599.
- Liao, D.M., Ng, Y.K., Tay, S.S.W., Ling, E.A. & Dheen, S.T., 2004. Altered gene expression with abnormal patterning of the telencephalon in embryos of diabetic Albino Swiss mice. *Diabetologia*, 47, 523-531.
- Liu, A.M. & Niswander, L.A., 2005. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 945-954.
- Macintosh, M.C.M., Fleming, K.M., Bailey, J.A., Doyle, P., Modder, J., Acolet, D., Golightly, S. & Miller, A., 2006. Perinatal mortality and congenital anomalies in babies of women with type 1 or type 2 diabetes in England, Wales, and Northern Ireland: population based study. *British Medical Journal*, 333, 177-180.
- Martinez-Frias, M.L., Bermejo, E., Rodriguez-Pinilla, E. & Prieto, L., 1998. Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in gestational diabetic mothers. *American Journal of Medical Genetics*, 78, 140-145.
- Moore, K.L. & Persaud, T.V.N., 2002. Zrození člověka. Praha: ISV nakladatelství.

- Moore, L.L., Singer, M.R., Bradlee, M.L., Rothman, K.J. & Milunsky, A., 2000. A prospective study of the risk of congenital defects associated with maternal obesity and diabetes mellitus. *Epidemiology*, 11, 689-694.
- Naylor, C.D., Sermer, M., Chen, E.L. & Sykora, K., 1996. Cesarean delivery in relation to birth weight and gestational glucose tolerance - Pathophysiology or practice style? *Jama-Journal of the American Medical Association*, 275, 1165-1170.
- New, D.A.T., 1955. A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 3, 320-&.
- Nielsen, G.L., Norgard, B., Puho, E., Rothman, K.J., Sorensen, H.T. & Czeizel, A.E., 2005. Risk of specific congenital abnormalities in offspring of women with diabetes. *Diabetic Medicine*, 22, 693-696.
- Obrien, R.M. & Granner, D.K., 1991. Regulation of gene-expression by insulin. *Biochemical Journal*, 278, 609-619.
- Oecd, 2001. Prenatal developmental toxicity study, OECD guideline for testing chemicals, Section 4. *OECD publishing*.
- Patwardhan, V., Gokhale, M. & Ghaskadbi, S., 2004. Acceleration of early chick embryo morphogenesis by insulin is associated with altered expression of embryonic genes. *International Journal of Developmental Biology*, 48, 319-326.
- Penney, G.C., Mair, G. & Pearson, D.W.M., 2003. Outcomes of pregnancies in women with type I diabetes in Scotland: a national population-based study. *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 110, 315-318.
- Perušičová, J., 2006a. Inzulínová léčba u nemocných cukrovkou: historie, minulost a současnost, I. část: historie. *Sestra v diabetologii*, 2.
- Perušičová, J., 2006b. Inzulínová léčba u nemocných cukrovkou: historie, minulost a současnost, II. část: humánní inzulíny. *Sestra v diabetologii*, 2.
- Perušičová, J., 2006c. Inzulínová léčba u nemocných cukrovkou: historie, minulost a současnost, III. část: inzulínová analoga. *Sestra v diabetologii*, 2.
- Peterka, M. & Fára, M., 1990. Jsou vitamíny embryotoxické. *Praktický lékař*, 70, 567-569.
- Peterka, M., Jelinek, R. & Pavlik, A., 1992. Embryotoxicity of 25 psychotropic-drugs - a study using CHEST. *Reproductive Toxicology*, 6, 367-374.
- Peterka, M., Miler, I. & Jelinek, R., 1994a. Teratogenic effects of bilirubin--a study using chick embryotoxicity screening test (CHEST). *Functional and developmental morphology*, 4, 29-32.
- Peterka, M. & Novotná, B., 2010. Úvod do teratologie, příčiny a mechanismy vzniku vrozených vad. Praha: Nakladatelství Karolinum, Univerzita Karlova v Praze.
- Peterka, M., Peterkova, R. & Likovsky, Z., 1996. Teratogenic and lethal effects of long-term hyperthermia and hypothermia in the chick embryo. *Reproductive Toxicology*, 10, 327-332.
- Peterka, M., Sarin, S., Roeder, E., Wiedenfeld, H. & Halaskova, M., 1994b. Differing embryotoxic effects of senecionine and senecionine-N-oxide on the chick embryo. *Functional and developmental morphology*, 4, 89-92.
- Phelan, S.A., Ito, M. & Loeken, M.R., 1997. Neural tube defects in embryos of diabetic mice - Role of the Pax-3 gene and apoptosis. *Diabetes*, 46, 1189-1197.
- Platt, M.J., Stanisstreet, M., Casson, I.F., Howard, C.V., Walkinshaw, S., Pennycook, S. & Mckendrick, O., 2002. St Vincent's Declaration 10 years on: outcomes of diabetic pregnancies. *Diabetic Medicine*, 19, 216-220.
- Polonsky, K.S., 2000. Dynamics of insulin secretion in obesity and diabetes. *International Journal of Obesity*, 24, S29-S31.

- Powe, C.E., Levine, R.J. & Karumanchi, S.A., 2011. Preeclampsia, a Disease of the Maternal Endothelium The Role of Antiangiogenic Factors and Implications for Later Cardiovascular Disease. *Circulation*, 123, 2856-2869.
- Queisser-Luft, A., Kieninger-Baum, D., Menger, H., Stolz, G., Schlaefer, K. & Merz, E., 1998. Does maternal obesity increase the risk of congenital anomalies? Analysis of 20,248 newborn in the Mainz birth register. *Ultraschall in Der Medizin*, 19, 40-44.
- Ray, J.G., Vermeulen, M.J., Meier, C. & Wyatt, P.R., 2004. Risk of congenital anomalies detected during antenatal serum screening in women with pregestational diabetes. *Qjman International Journal of Medicine*, 97, 651-653.
- Remsberg, K.E., Mckeown, R.E., Mcfarland, K.F. & Irwin, L.S., 1999. Diabetes in pregnancy and cesarean delivery. *Diabetes Care*, 22, 1561-1567.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E. & Tabin, C., 1993. Sonic-hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75, 1401-1416.
- Rudge, M.V.C., Calderon, I.D., Ramos, M.D., Abbade, J.F. & Rugolo, L., 2000. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes - A retrospective 10-year analysis. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 50, 108-112.
- Sharpe, P.B., Chan, A., Haan, E.A. & Hiller, J.E., 2005. Maternal diabetes and congenital anomalies in South Australia 1986-2000: A population-based cohort study. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology*, 73, 605-611.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A. & Zimmet, P.Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87, 4-14.
- Siddiqui, K., Musambil, M. & Nazir, N., 2015. Maturity onset diabetes of the young (MODY)-History, first case reports and recent advances. *Gene*, 555, 66-71.
- Spellacy, W.N., Miller, S., Winegar, A. & Peterson, P.Q., 1985. Macrosomia - maternal characteristic and infant complications. *Obstetrics and Gynecology*, 66, 158-161.
- Stewart, J.M. & Stoll, S., 1979. Familial caudal regression anomalad and maternal diabetes. *Journal of Medical Genetics*, 16, 17-20.
- Stotland, N.E., Caughey, A.B., Breed, E.M. & Escobar, G.J., 2004. Risk factors and obstetric complications associated with macrosomia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 87, 220-226.
- Stroustrup Smith, A., Grable, I. & Levine, D., 2004. Case 66: caudal regression syndrome in the fetus of a diabetic mother. *Radiology*, 230, 229-33.
- Sturkie, P.D., Benzo, C.A., Brown, K.I., Duke, G.E., Fedde, M.R., Glick, B., Griminger, P., Harvey, A.L., Harvey, S., Hazelwood, R.L., Johnson, A.L., Kare, M.R., Kenny, A.D., Mason, J.R., Marshall, I.G., Meyer, D.B., Meyer, D.C., Ringer, R.K., Scanes, C.G., Wentworth, B.C. & Whittow, G.C., 1986. Avian physiology. Kingsport, Tennessee: Kingsport press.
- Temple, R., Aldridge, V., Greenwood, R., Heyburn, P., Sampson, M. & Stanley, K., 2002. Association between outcome of pregnancy and glycaemic control in early pregnancy in type 1 diabetes: population based study. *British Medical Journal*, 325, 1275-1276.
- Trojan, S., 2003. Lékařská fyziologie. Praha: Grada publishing a.s.
- Turková, A., 2011. Porovnání embryotoxického účinku inzulinu a glukózy metodou CHEST. Univerzita Karlova.
- Ujházy, E., Dubovický, M. & Mach, M., 2014. TERATOLÓGIA: Princípy a hodnotenie abnormálneho vývinu. Bratislava: Slovenská toxikologická spoločnosť (SETOX).
- Vaarasmaki, M., Gissler, M., Ritvanen, A. & Hartikainen, A.L., 2002. Congenital anomalies and first life year surveillance in Type 1 diabetic births. *Diabetic Medicine*, 19, 589-593.

- Waller, D.K., Mills, J.L., Simpson, J.L., Cunningham, G.C., Conley, M.R., Lassman, M.R. & Rhoads, G.G., 1994. Are obese women at higher risk for producing malformed offspring. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 170, 541-548.
- Watkins, M.L., Rasmussen, S.A., Honein, M.A., Botto, L.D. & Moore, C.A., 2003. Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics*, 111, 1152-1158.
- WHO, 1967. Principles for the testing of drugs for teratogenicity. Report of a WHO scientific group. *World Health Organization technical report series*, 364, 1-18.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King, H., 2004. Global prevalence of diabetes - Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-1053.
- Yang, J., Cummings, E.A., O'connell, C. & Jangaard, K., 2006. Fetal and neonatal outcomes of diabetic pregnancies. *Obstetrics and Gynecology*, 108, 644-650.
- Yang, W., Lu, J., Weng, J., Jia, W., Ji, L., Xiao, J., Shan, Z., Liu, J., Tian, H., Ji, Q., Zhu, D., Ge, J., Lin, L., Chen, L., Guo, X., Zhao, Z., Li, Q., Zhou, Z., Shan, G., He, J. & China Natl Diabet Metab, D., 2010. Prevalence of Diabetes among Men and Women in China. *New England Journal of Medicine*, 362, 1090-1101.

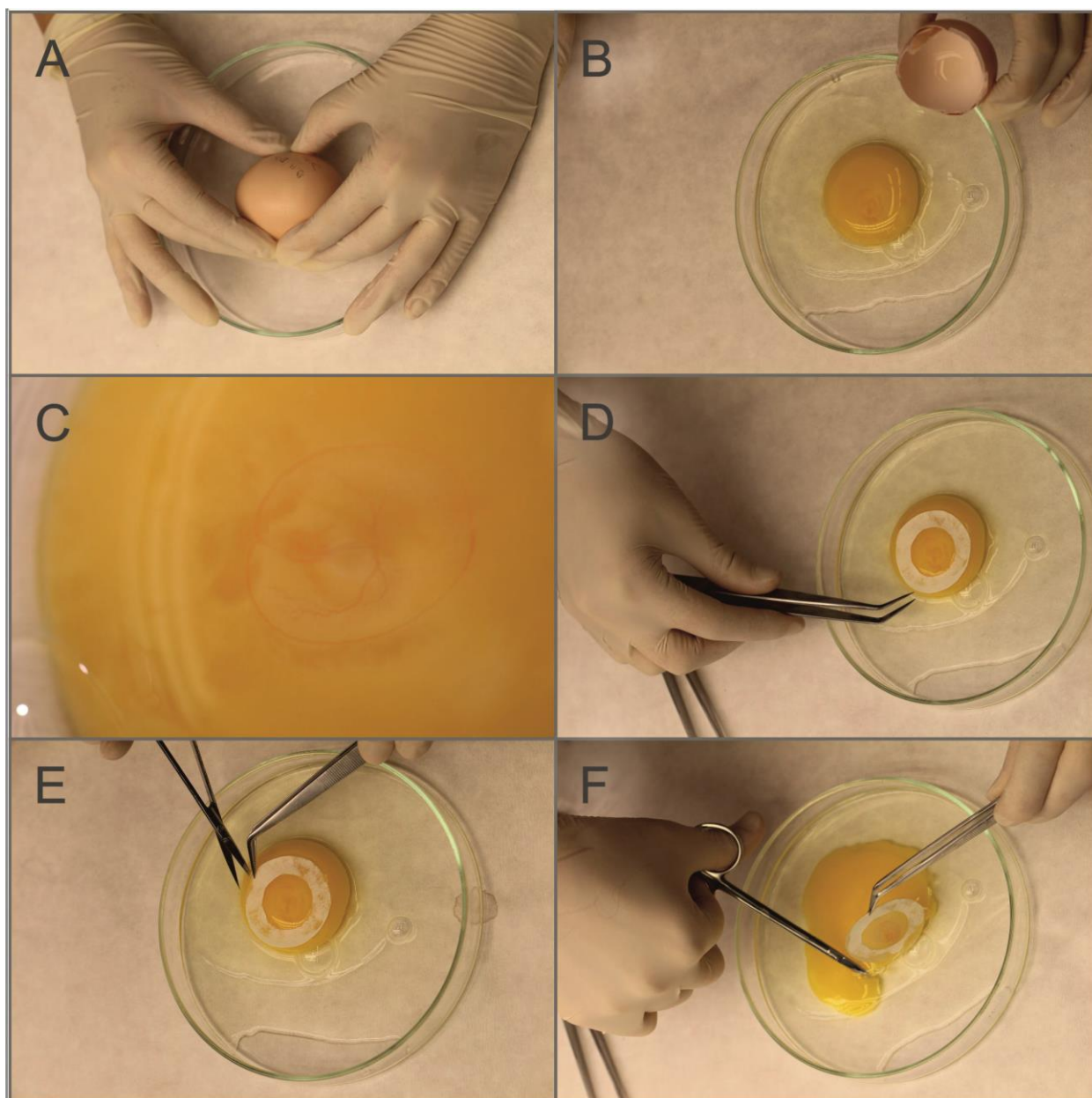
7.1 Internetové zdroje

URL(1): <http://stemcellthailand.org/therapies/diabetes-mellitus-type-1-2/>; citováno dne 5.8.2015

URL(2): <http://www.morrishatchery.com/images/cobb-500web.jpg>; citováno dne 4.7.2014

8 Přílohy

8.1 Přenesení zárodku do *in vitro* systému



A- Rozklepnutí vejce o dno Petriho misky

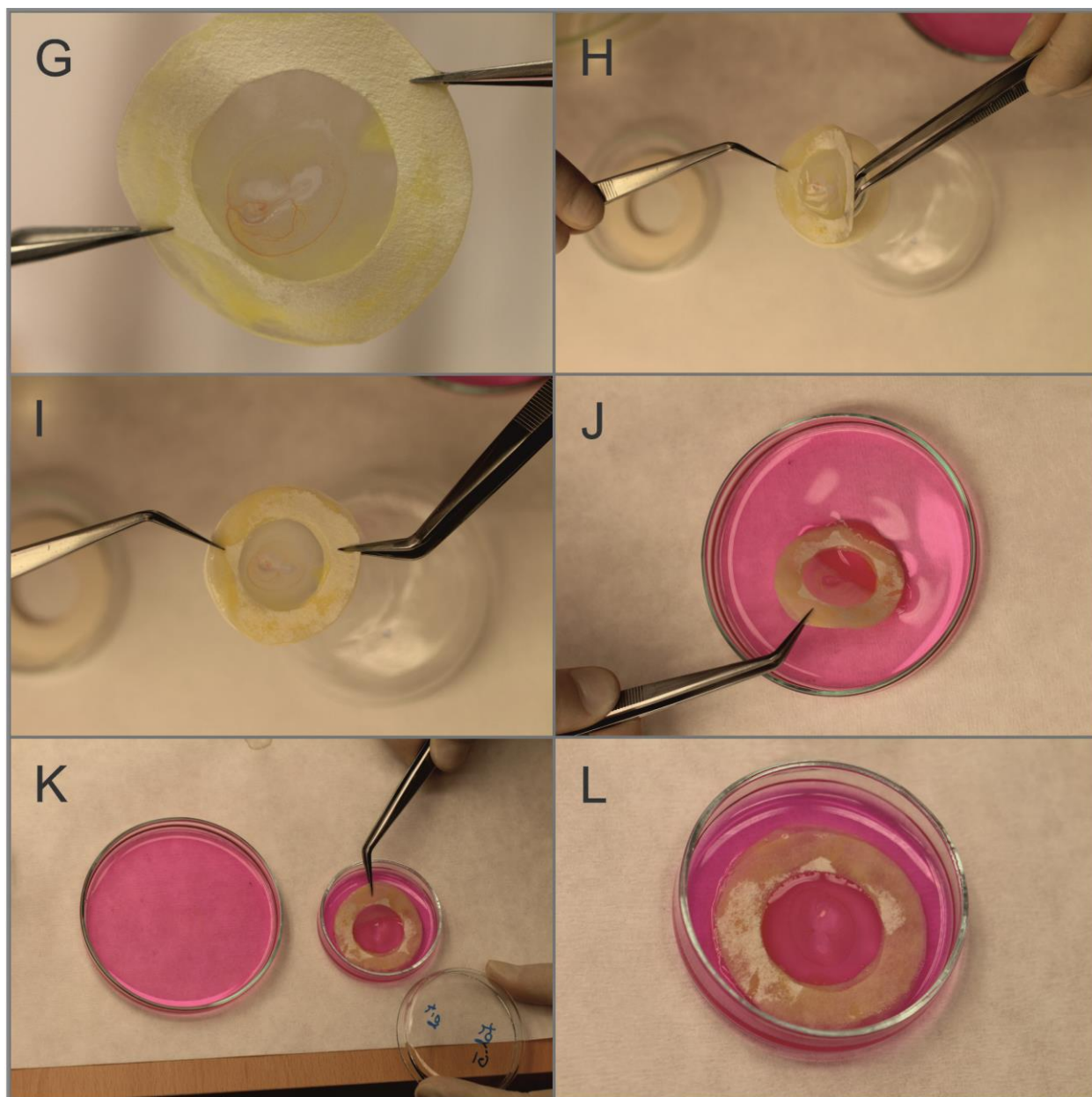
B- Vejce v Petriho misce vyjmuté se skořápky

C- Detail kuřecího zárodku

D- Umístění kroužku z filtračního papíru kolem zárodku kuřete

E- Nastřížení žloutkového vaku

F- Obstřížení kroužku z filtračního papíru a vyjmutí zárodku z přirozeného prostředí



G- Detail kuřecího zárodku v kroužku z filtračního papíru

H- Podložení systému kroužek-zárodek druhým kroužkem z filtračního papíru

I- Přilepení spodního kroužku a vytvoření systému kroužek-zárodek-kroužek

J- Opláchnutí zárodku od přebytečného žloutku

K- Položení zárodku do Petriho misky s živným médiem

L- Kuřecí kultura *in vitro* vytvořená metodou SANDWICH

8.2 Video porovnávající vitalitu zárodku exponovaného inzulinem a kontrolního

Viz přiložené CD.

Vlevo je zárodek v ED4 vystavený inzulinu v koncentraci 10^{-4} mg/ml. Zárodek vykazuje horší vitalitu, defekty ve tvorbě vitelinních cév a vývoji kaudální části. Vpravo je stejně starý kontrolní zárodek. Měřítka je 1cm.